

**Résumés des projets autorisés utilisant des animaux à des fins scientifiques
Premier semestre 2020 (du 2 janvier 2020 au 30 juin 2020)**

14332 La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative caractérisée notamment par une perte des neurones dopaminergiques du mésencéphale (région du tronc cérébral reliée au cerveau). Cliniquement, cette maladie est définie par une triade de symptômes moteurs une bradykinésie (ralentissement de l'initiation du mouvement), une rigidité musculaire et des tremblements de repos. À côté de ces symptômes moteurs, différents symptômes non-moteurs peuvent être présents et apparaître parfois même avant les premiers symptômes moteurs, ce qui peut ralentir le diagnostic de la maladie. Comprendre les mécanismes physiopathologiques sous-tendant ces symptômes dans la maladie de Parkinson est important et nécessite de passer par des études pré-cliniques.

La queue de l'aire tegmentale ventrale ou tVTA, découverte il y a une dizaine d'années chez le rat, est considérée aujourd'hui comme le centre de contrôle majeur des neurones dopaminergiques du mésencéphale et notamment des neurones de la substance noire compacte (région également mésencéphalique). Le but de ce projet est d'évaluer l'influence qu'exerce la tVTA sur le contrôle des neurones de la SNc dans un modèle de maladie de Parkinson. Le modèle utilisé est une lésion bilatérale partielle de la SNc par une neurotoxine, 6-OHDA. Afin d'évaluer l'influence de la tVTA, nous réaliserons également une lésion bilatérale de la tVTA en utilisant l'acide iboténique, qui induit une destruction des neurones dans la structure injectée. Nous pourrions donc visualiser l'effet de la co-lésion SNc/tVTA sur les symptômes moteurs et non-moteurs présents dans ce modèle grâce à différents tests comportementaux.

Pour assurer la validité statistique des résultats, le projet nécessitera 60 rats Sprague Dawley. Il sera conduit en respectant la règle des 3R. Les études comportementales prévues dans ce projet nécessitent l'utilisation d'animaux vivants et ne nous permettent pas de remplacement. L'ensemble des tests comportementaux que nous utiliserons pour ce projet ont été validés, de plus notre expertise dans le domaine permet de réduire au plus juste le nombre d'animaux utilisés par groupe. En ce qui concerne le raffinement, le bien-être animal sera amélioré grâce à l'hébergement des animaux en groupe dans des cages enrichies par des morceaux de bois à ronger. Les procédures chirurgicales seront réalisées sous anesthésie générale et analgésie pré, per et post-opératoire permettant de limiter la souffrance et le stress imposés aux animaux. Les animaux seront suivis quotidiennement afin de déceler tous signes d'inconfort ou de stress et des fiches d'évaluations individuelles nous permettront de suivre la bonne récupération des animaux après les chirurgies. Des points limites sont établis afin d'empêcher une souffrance non nécessaire aux animaux.

14333 Notre équipe travaille sur les vecteurs (principalement de type moustique) et les maladies infectieuses qu'ils transmettent. Les maladies à transmission vectorielle représentent plus de 17% des cas de maladies infectieuses, et provoquent près d'un million de décès chaque année. De ce fait, l'objectif général de notre plateforme est d'utiliser les moustiques sains produits dans des projets de recherche dans divers domaines et notamment, en santé publique dans le cadre d'expertise pour l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) ou de travaux de recherche. Plus précisément, l'objectif du projet est d'évaluer l'efficacité de formulations insecticides ou répulsives contre les moustiques afin de mettre en œuvre des moyens de protection efficaces contre les maladies à transmission vectorielle. En effet, les femelles moustiques ont besoin d'un repas sanguin pour mûrir leurs œufs et c'est donc lors de cette pique que les femelles moustiques peuvent transmettre des pathogènes tel que le virus Zika, la dengue ou des parasites type plasmodium responsable du paludisme.

Dans ce cadre, nous avons besoin d'utiliser un animal

Soit pour tester l'inhibition du repas sanguin des moustiques lors d'évaluation de formulations répulsives. Si aucun moustique n'a piqué et ne s'est posé sur l'animal, à l'issue du temps donné, la formulation pourra être considérée comme répulsive. A contrario, si les moustiques se sont gorgés, celle-ci n'aura pas démontré d'activité répulsive. L'animal est donc utilisé comme système attractant.

Soit pour suivre les traits d'histoire de vie de moustiques ayant déjà été en contact avec des formulations insecticides et/ou répulsives. Les moustiques traités doivent prendre un repas de sang afin de déterminer l'effet de la substance sur le nombre d'œufs pondus, nombre d'œufs éclos, ... L'animal est utilisé comme source de sang pour le moustique.

Concernant le remplacement, nous utilisons préférentiellement un système artificiel pour réaliser les gorgements lorsque c'est possible, mais certaines souches surtout si elles ont été prélevés sur le terrain, ne se gorge pas ou très peu sur système artificiel. C'est dans ce cas que nous devons un animal pour le gorgement. Par contre, il n'existe à ce jour pas de système attractant artificiel efficace qui simule réellement la présence d'un animal pour les tests d'inhibition de repas sanguin.

Les animaux que nous utilisons sont des lapins femelles adultes. Le nombre de lapin utilisé au cours du projet est de 5. Suivant que l'on fasse un test d'inhibition de repas de sang et/ou un gorgement de moustiques traités dans une même semaine, nous pouvons utiliser entre 2-5 lapins par semaines. Ces tests se font dans un environnement calme, à 25°C. Les lapins sont maintenus en contention afin qu'il ne bouge pas et ne se blesse pas. La contention est limitée à 30 min dans le cadre de test d'inhibition de repas sanguin et entre 20 et 60 min maximum pour un gorgement. Les lapins sont surveillés au maximum toutes les 10 min pendant la période de contention. Toutefois, si l'accélération de la fréquence respiratoire, des signes d'agitation devaient apparaître, le lapin est défait de sa contention et remis dans sa cage de transport au calme. L'utilisation d'un même lapin par semaine est limitée de 1 à 3 fois par semaine selon les périodes de tests et les projets en cours et cela permet de limiter le nombre total d'animaux sur le projet.

Pour chaque nouveau lapin, une phase d'adaptation est mise en place, c'est à dire que les lapins sont habitués à la mise en contention avant de pouvoir réaliser des tests. Le suivi de la mise en contention est ensuite effectué via un fichier de suivi contenant le numéro d'identification du lapin, le jour et la personne qui s'est occupé de la contention.

A la fin des tests, le ventre ou les oreilles du lapin (selon le test concerné) sont rincés avec un antiseptique et/ou une eau savonneuse afin d'éliminer les résidus de substances insecticides et/ou répulsives. On libère ensuite le lapin et on le replace dans sa caisse de transport, dans la pièce dédiée à l'accueil des animaux, avant d'être ramené à l'animalerie.

Pendant et après une période de tests, les lapins sont surveillés, nous veillons à ce qu'ils ne déclenchent pas de réactions allergiques. Ils sont régulièrement contrôlés par le personnel de l'animalerie. Aucun cas de dermatose n'a été observé à ce jour. De plus, concernant les piqûres de moustiques, il est à noter que les lapins ne présentent rapidement plus de réaction inflammatoire (désensibilisation rapide), contrairement à l'Homme. En terme de raffinement, les lapins sont hébergés dans des cages individuelles dotées d'un abri dans lequel le lapin peut se cacher et se loger au-dessus pour surveiller ses alentours et ses congénères. Un enrichissement a également été ajouté sous forme de rondin de bois avec lesquels les lapins peuvent jouer ou ronger. Les lapins sont conservés aussi longtemps que possible et euthanasiés s'ils présentent des signes de stress ou maladie chronique, d'amaigrissement sévère ou s'ils deviennent trop vieux.

14334 Le demandeur est amené à réaliser, pour le compte de clients, des traitements prolongés par des produits étudiés pour leur efficacité potentielle pour traiter des pathologies du système nerveux central. Ces produits seront administrés de manière à être présents dans l'organisme pendant des durées allant de quelques jours à plusieurs semaines (maximum 24 semaines), la durée choisie étant fonction des pathologies pour le traitement desquelles les produits seront étudiés.

Pour différentes raisons scientifiques, techniques et de bien-être de l'animal, il a été choisi d'administrer ces substances au moyen de pompes osmotiques placées sous la peau.

L'implantation de pompes osmotiques à des souris a pour objectif d'administrer des substances par voie sous-cutanée et de manière continue, sur des périodes prolongées (plusieurs jours à plusieurs semaines).

Ce mode d'administration de produits présente deux avantages comparativement à un autre mode d'administration fréquemment utilisé, l'injection répétée (une ou plusieurs fois par jour pendant plusieurs jours ou plusieurs semaines) par voie sous-cutanée :

- Un avantage scientifique et technique : la quantité de produit dans l'organisme reste constante dans le cas d'une administration par pompe osmotique alors qu'elle fluctue en fonction des injections répétées.

- Un avantage au niveau du bien-être de l'animal. Dans le cas de l'implantation d'une pompe osmotique, l'animal subit une opération unique, dans le cas où une seule pompe osmotique permet l'administration du produit pendant toute la durée du traitement, ou un nombre limité d'opérations (maximum six) dans le cas où le produit doit être administré pendant une durée supérieure à celle qui peut être couverte par une seule pompe. En revanche, des administrations sous-cutanées répétées (une à plusieurs fois par jour, selon la pharmacocinétique du produit) sont susceptibles de générer un stress ou un inconfort de l'animal, du fait même de leur répétition.

L'inconvénient de l'administration de produit par pompe osmotique est qu'elle nécessite une anesthésie et une opération plus invasive que dans le cas d'administrations par voie sous-cutanée. Néanmoins, le fait que l'opération n'est réalisée qu'un nombre limité de fois compense très largement le stress généré par des injections nombreuses et répétées.

Les implantations de pompes osmotiques seront réalisées sur des souris transgéniques (Tg) ou non génétiquement modifiées (WT : wild type). Les souris Tg seront des modèles de pathologies humaines, notamment de maladie d'Alzheimer et notamment des souris P301S qui sont un modèle d'Alzheimer. Les souris P301S présentent un certain nombre de déficits tels que des déficits moteurs, les premiers symptômes étant un ralentissement moteur qui évolue progressivement en paralysie et des déficits cognitifs et de mémoire. Au stade avancé de la pathologie, le phénotype est dommageable.

A l'issue des traitements, les souris seront envoyées dans un laboratoire du sponsor et soumises à des tests de comportement.

Les produits testés seront destinés à réduire les symptômes moteurs et cognitifs. Ils n'ont potentiellement pas d'effet délétère, de tels effets étant incompatibles avec leurs effets thérapeutiques.

Nombre maximum de produits étudiés par an : 20.

Nombre maximum d'animaux utilisés : 13000 sur 5 ans.

Ces chiffres constituent une estimation faite sur la base de l'évaluation faite à ce jour des besoins des clients du demandeur.

Une nouvelle demande sera faite dans le cas où ces chiffres devraient être dépassés.

Respect de la règle des 3R.

- Réduire. Le nombre d'animaux utilisés sera évalué, pour chaque étude de produit, de manière à garantir des résultats statistiquement interprétables. Il ne sera pas utilisé un nombre d'animaux plus important.

- Raffiner. Des animaux présentant des signes de souffrance consécutifs au phénotype (cas envisageable) ou provoqué par le produit testé (cas a priori exclu, ce type d'effet étant un critère pour exclure le produit) seront mis à mort. Outre la motivation éthique conduisant à cette mise à mort, celle-ci est requise pour des raisons expérimentales, la souffrance d'un animal biaisant les variables biologiques mesurées, en particulier les variables comportementales. L'utilisation de traitements pour pallier à cette souffrance est exclue, ces types de traitement étant susceptibles d'interférer avec l'action pharmacologique des produits étudiés.

- Remplacer. Les études qui seront réalisées ont pour objectif d'évaluer l'action de produits sur des paramètres biologiques, en particulier le comportement. Il n'existe à ce jour aucun modèle alternatif

n'utilisant pas d'animaux vivants, ou utilisant des animaux d'autres espèces, ou ayant un degré de sévérité inférieur, qui permette d'évaluer l'efficacité thérapeutique potentielle des traitements étudiés.

14335 Le but de la dosimétrie est d'évaluer quantitativement l'énergie déposée dans la matière. La grandeur physique de base de la dosimétrie est la dose absorbée qui exprime la partie de l'énergie transportée par les rayonnements qui est déposée dans la matière dans laquelle ils interagissent et induisent des effets. Elle correspond à l'énergie moyenne cédée par le rayonnement par unité de masse. La dose absorbée est une grandeur fondamentale qui permet de faire une mesure macroscopique pouvant être corrélée aux effets des rayonnements de tout système biologique. Ainsi la dosimétrie est un aspect essentiel pour le développement et le bon déroulement des projets de recherche utilisant des rayonnements ionisants.

L'objectif de ce projet est d'effectuer une caractérisation dosimétrique des modèles d'irradiation patte développés sur nos installations d'irradiation, à haute énergie et basse énergie, permettant de mimer les brûlures radiologiques pouvant survenir dans un contexte de surexposition médicale ou accidentelle par exemple. En effet, le dépôt d'énergie local dû aux électrons secondaires créés peut être très différent d'un matériau à l'autre et jouer un rôle encore plus important pour les installations utilisant des rayonnements X de basse énergie. L'objectif de ce projet sera double car nous souhaitons d'une part connaître avec précision la dose réellement absorbée par l'os lors de l'irradiation et d'autre part quantifier et suivre l'évolution de la dose à l'os au cours du temps. En effet, pour tous les projets de recherche utilisant ces modèles d'irradiation, des analyses sont réalisées à différents temps post-irradiation et nous souhaitons caractériser les modèles dans leurs intégralités.

Pour ce projet nous projetons d'utiliser 100 souris. L'utilisation des animaux est nécessaire pour ce projet afin d'avoir une estimation précise de la dose absorbée par l'os mais l'objectif à long terme est de valider ces protocoles d'irradiation. Les conditions de soins et d'hébergement des animaux sont adaptés aux procédures réalisées afin de limiter le plus possible la souffrance de l'animal (utilisation d'anesthésique pendant les irradiations, surveillance des animaux après irradiation et scoring lésionnel).

14336 Chez les patients présentant des douleurs pelvi-périnéales chroniques, une sous-population est dite sensibilisée. Cette sensibilisation est caractérisée par des douleurs majorées ou provoquées par des stimulations d'intensité normalement non nociceptive, la persistance de la douleur malgré l'arrêt de la stimulation et une diffusion au-delà de la zone stimulée. Ces caractéristiques d'abaissement de seuil douloureux, de diffusion spatiale et temporelle sont propres aux mécanismes de la sensibilisation. Les troubles digestifs présentés par ces patients sont proches de ceux du syndrome de l'intestin irritable chez qui des études récentes ont montré la capacité du microbiote intestinal à reproduire dans un système sain les lésions observées chez des patients et une corrélation entre ces altérations et la sévérité des symptômes douloureux. En particulier, dans ce syndrome, le surnageant fécal induit des modifications de la barrière épithéliale intestinale et une hypersensibilité viscérale chez l'animal sain. À ce jour, le lien entre la sensibilisation pelvienne, le microbiote intestinal et l'induction de dysfonctions digestives induites par le surnageant fécal reste à étudier. Une meilleure compréhension de la physiopathologie sous-jacente permettrait d'identifier, des biomarqueurs prédictifs de la sensibilisation pelvienne et de nouvelles cibles thérapeutiques.

Une biocollection de selles a été recueillie à partir d'une cohorte de 30 patientes douloureuses chroniques phénotypées sur le plan clinique (15 patientes sensibilisées selon les critères de Convergences PP et 15 patientes non sensibilisées et 15 patientes saines). L'objectif de cette étude est de comparer dans un modèle murin, les effets du surnageant de selles sur le système nerveux entérique, le système nerveux central et la barrière intestinale et vésicale en termes d'excitabilité neuronale, de perméabilité de la barrière et de l'expression des médiateurs pro-inflammatoires entre ces trois populations.

Ce projet sera réalisé en tenant compte du principe des 3R (Réduire, Raffiner et Remplacer). Le nombre de souris a été réduit au minimum possible tout en permettant une analyse statistique fiable

(Réduire). Afin de limiter toutes sources d'angoisse et de souffrance, l'instillation des préparations fécales sera effectuée sous anesthésie à l'isoflurane. Le bien-être des souris sera surveillé tout au long de l'étude tous les jours, avec une mise en place d'un enrichissement par frisois, et en évaluant l'état général des animaux, et des points limites seront mis en place. En cas d'éventuels signes de souffrance les animaux seront euthanasiés (Raffiner). La corrélation *in vitro-in vivo* n'étant pas satisfaisante, le recours à l'utilisation de modèles animaux est indispensable dans notre étude et il n'y a pas d'alternative au Remplacement.

Les expériences seront réalisées en plusieurs fois et ce projet nécessitera 90 animaux (souris C57Bl6) maximum.

14337 Ce projet a pour but de caractériser les effets des radiations ionisantes, utilisées notamment à des fins thérapeutiques dans le cadre des radiothérapies, sur la fonction des cellules souches hématopoïétiques (CSH).

Les CSH sont capables de s'auto-renouveler et de donner par différenciation l'ensemble des cellules sanguines, de la lignée lymphoïde (lymphocytes B, T) et de la lignée myéloïde (plaquettes, globules rouges, monocytes ...). Il est donc crucial de maintenir l'intégrité de ces cellules tout au long de la vie. Après irradiation, ces cellules perdent leur fonction. Elles ne sont plus capables de s'auto-renouveler, et présentent un biais de leur différenciation vers la lignée myéloïde. Cela explique pourquoi les patients traités par radiothérapie pour différents types de cancer présentent un risque accru de développer des leucémies. Nous avons montré, chez la souris, qu'une injection, une heure avant irradiation, d'une cytokine importante pour la fonction des CSH, est suffisante pour les protéger des effets délétères des radiations.

Notre objectif est maintenant de comprendre les mécanismes moléculaires à l'origine de la perte de fonction des CSH après irradiation, et de l'effet protecteur de cette cytokine. Notre but est d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques dans la prévention des dommages liés à l'irradiation et dans le traitement des leucémies.

De par sa proximité physiologique avec l'homme, la souris est un modèle de choix pour cette étude. Les CSH des souris ont fait l'objet de nombreuses études et sont bien caractérisées, ce qui facilite leur utilisation.

L'hématopoïèse est le processus physiologique qui conduit à la formation de toutes les cellules du sang. C'est un processus qui met en action plusieurs cellules de la niche hématopoïétique, que l'on ne sait pas encore reproduire *in vitro*. Il ne peut par conséquent pas être pleinement étudié *in vitro*. D'autre part, nous travaillons sur les cellules souches hématopoïétiques, qui différencient dès qu'elles sont mises en culture *in vitro* à partir du moment où nous travaillons hors de l'organisme, nous ne travaillons plus sur des CSH. Finalement, si de nombreux marqueurs permettent la caractérisation phénotypique des CSH, leur caractérisation finale est fondée sur leur capacité unique de reconstituer l'hématopoïèse dans son ensemble. Cette fonction ne peut être testée que sur animal vivant.

Notre hypothèse est que l'irradiation affecte la fonction des CSH en perturbant des mécanismes épigénétiques, responsables du contrôle de l'expression des gènes (transcriptome) dans les CSH. La cytokine d'intérêt préviendrait ces altérations. Notre objectif est donc de tester l'effet des radiations et de cette cytokine, ainsi que des acteurs de la voie de signalisation qu'elle active, sur l'épigénétique et le transcriptome des CSH.

Pour cela, différentes études à l'échelle du génome entier dans les CSH devront être réalisées, et confirmées dans des groupes d'animaux différents. Afin de déterminer les effets précoces de l'irradiation sur la physiologie des CSH, et leur conséquence à long terme, ces expériences seront réalisées à court terme (2h) ou à long terme (1 mois) après irradiation.

Finalement, pour tester si les variations d'expression génique sont à l'origine de la perte de fonction des CSH, des expériences de transplantations seront réalisées.

Pour ces différents types d'expérience, notre projet nécessite l'utilisation d'au maximum 3680 souris sur 3 ans.

Si les CSH peuvent être caractérisées phénotypiquement, l'étude de leur fonction ne peut être évaluée qu'*in vivo*, après transplantation dans des souris receveuses préalablement irradiées, par leur capacité unique à reconstituer l'hématopoïèse dans son ensemble et à long terme. D'autre part, les CSH sont dépendantes de la niche dans laquelle elles évoluent. Leur réponse aux stress ne peut être évaluée correctement qu'en les maintenant dans leur environnement physiologique, que nous ne savons pour le moment pas reproduire *in vitro*. Pour toutes ces raisons, l'évaluation des effets de l'IR ne peut se faire que par des expériences *in vivo*.

Nous appliquerons toujours le principe de réduction.

Toutes les expériences préliminaires seront réalisées *in vitro*, sur des cellules isolées, préalablement aux transplantations, ces dernières n'étant mises en jeu que pour confirmer en dernier lieu nos données. De plus, les différentes expériences seront réalisées sur des cohortes d'animaux les plus petites possibles, mais assez grandes pour nous permettre d'obtenir des résultats fiables et significatifs d'un point de vue statistique. Les nombres d'animaux nécessaires ont été évalués suite à notre expérience obtenue sur des expériences similaires.

Plusieurs mesures seront mises en œuvre pour remédier à la contrainte. Notamment, une surveillance quotidienne des animaux irradiés ou transplantés sera réalisée. En cas de signe de souffrance (posture anormale, activité physique ralentie, perte de poids rapide), les points limite d'arrêt seront immédiatement appliqués. Tous les prélèvements sanguins et les injections seront réalisés sous anesthésie générale.

Le milieu de vie des souris sera enrichi en tout temps (coton de nidification, maisons) pour garantir leur bien-être.

14338 L'hypertension pulmonaire est une maladie progressive grave qui touche les petits vaisseaux sanguins des poumons et dont le symptôme principal est l'essoufflement à l'effort. Ces vaisseaux transportent le sang à partir du cœur vers les poumons, où il se charge en oxygène (O₂) pour alimenter tout l'organisme. L'évolution naturelle de cette maladie varie fortement d'un individu à l'autre, mais elle conduit à une insuffisance cardiaque droite responsable du décès du patient seulement quelques années après la déclaration de la maladie. De nombreux médicaments permettent de réduire les symptômes de l'hypertension pulmonaire, cependant aucuns permettent à ce jour un traitement complet de la maladie. Lorsque l'hypertension pulmonaire menace la vie du patient, ces patients peuvent subir une greffe cœur-poumon. Clairement l'inflammation pulmonaire est décrite pour contribuer au développement de différentes formes d'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP), cependant les mécanismes impliquant les mécanismes inflammatoires dans l'étiologie de la maladie sont mal connus. Très récemment des mutations dans le gène *KCNK3* ont été identifiées chez des patients atteints d'HTAP, cependant le rôle de ce gène dans le développement de l'hypertension pulmonaire n'est que très peu connu. Nous nous attacherons à étudier le rôle de ce gène dans l'hypertension artérielle pulmonaire induite par à un choc inflammatoire.

Notre étude porte sur les effets au niveau pulmonaire d'un choc inflammatoire chez l'animal. Ainsi, il est impossible de reproduire ces effets *in vitro* par des méthodes alternatives. Toutes les procédures seront pratiquées en utilisant des anesthésiques et des analgésiques. De plus, toutes les procédures de ce projet sont conçues pour respecter le principe des 3 R (Réduction, Raffinement, Remplacement). Ainsi, les fonctions cardiovasculaires seront étudiées par des méthodes non invasives permettant de limiter le nombre d'animaux utilisés. De plus, nous effectuerons un suivi longitudinal de la maladie par échocardiographie et par dosages des différents marqueurs de la maladie ce qui nous permettra de déterminer le moment où l'animal devra être mis à mort sans que celui-ci ne présente encore de symptômes de souffrance/douleur. Les animaux sont mis à mort en fin d'expérimentation et les tissus prélevés sont partagés afin de minimiser encore le nombre d'animaux utilisés. Des expériences de biochimie et de biologie moléculaire à partir des différents tissus collectés et des études sur cellules isolées seront effectuées dans la mesure du possible afin de réduire le nombre d'animaux utilisés. De l'enrichissement sera ajouté dans les cages des animaux. Pour limiter le nombre d'animaux utilisé, les fonctions cardiovasculaires seront étudiées par des méthodes non invasives. Les animaux seront surveillés

quotidiennement et leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer que les animaux ne subissent aucun stress.

Par une analyse statistique nous avons déterminé que 354 rats seront utilisés sur l'ensemble de l'étude en combinant plusieurs approches expérimentales par différents expérimentateurs sur le même animal. A l'heure actuelle les mécanismes responsables du développement de l'hypertension artérielle pulmonaire sont mal connus c'est pourquoi nous allons utiliser pour ce projet un modèle unique au monde de rat génétiquement modifié pour un gène retrouvé muté chez les patients atteints d'hypertension pulmonaire afin d'étudier les mécanismes mis en jeu par ces mutations.

14339 Ce projet s'inscrit dans le cadre d'un programme de recherche destiné à identifier de nouvelles molécules permettant de traiter la cirrhose hépatique.

Cette pathologie est définie par l'accumulation excessive de fibrose conduisant à la dégénérescence du foie. Suivant le stade, elle est difficilement réversible. L'incidence annuelle de la cirrhose du foie en France est estimée à 150 à 200 cas par million d'habitants avec un nombre de décès d'environ 15000 par an. C'est une des complications majeures des maladies chroniques du foie, qu'elles soient d'origine alcoolique, virale, métabolique ou liée à l'exposition à certains médicaments. La cirrhose constitue un terrain propice au développement des cancers primitifs du foie car elle s'accompagne d'une augmentation de la régénération anarchique des cellules hépatiques et donc du risque d'altérations génétiques. Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est de loin le cancer plus fréquent et il se développe dans plus de 90 % des cas sur une cirrhose, qu'elle qu'en soit l'origine.

La progression de la fibrose hépatique chez un individu est difficile à évaluer. Il s'agit d'un processus chronique qui chez une majorité des patients évolue vers la cirrhose dans un délai de 15 à 20 ans. La cirrhose se définit selon deux stades, la phase compensée, asymptomatique et détectée grâce à des anomalies caractéristiques lors de l'examen clinique, et la phase décompensée où la défaillance de l'organe entraîne l'apparition de complications. Les complications de la cirrhose sont très graves (hémorragies digestives liées à l'hypertension portale avec rupture de varices œsophagiennes et/ou gastriques, ascite, encéphalopathie liée à l'accumulation d'urée au niveau sanguin et pathologie hépatorénale) et en l'absence de prise en charge conduisent irrémédiablement au décès du patient.

A ce jour, aucune molécule n'a reçu d'autorisation de mise sur le marché pour traiter en soi la cirrhose et permettre de bloquer le processus qui conduit à la décompensation (stade irréversible) de la cirrhose. Aussi, plusieurs voies de recherche et de développement sont en cours pour palier à ce déficit. Afin d'étudier et d'étayer nos hypothèses lors du développement de nos molécules, il nous sera inévitable d'avoir recours à des modèles animaux mimant au mieux la pathologie humaine puisqu'actuellement aucune méthode alternative n'est disponible pour évaluer l'efficacité des molécules candidates.

La cirrhose est la résultante d'agressions hépatiques chroniques qui peuvent avoir diverses origines et qui peuvent se cumuler. Ainsi, les désordres métaboliques et notamment l'insulinorésistance, le stress oxydatif (tabagisme, alcoolisme) et les infections sont autant de composantes qui rendent la pathologie humaine difficilement transposable au modèle animal. Nous nous proposons de mettre en œuvre un modèle s'approchant davantage de la pathologie humaine que la majorité des modèles unifactorielles en prenant en compte la notion de multi-hit de la maladie. Ainsi, les animaux seront exposés de manière séquentielle à plusieurs agents favorisant la mise en place et le développement de la maladie.

Dans un premier temps, les animaux recevront des régimes spéciaux (riche en graisse et en sucre) qui permettront le développement d'un syndrome métabolique (diabète et dyslipidémie) nous associerons l'administration de thioacétamide (TAA) afin d'induire un stress oxydatif important. Enfin, nous administrerons du lipopolysaccharide (LPS) qui viendra mimer la composante infectieuse et ainsi compléter le panel multifactoriel d'atteinte hépatique. Cette dernière phase permettrait d'accélérer le processus de mécanisme de décompensation de la pathologie.

Une fois le modèle mis en place avec une phase clairement définie de cirrhose compensée et une phase de décompensation, les molécules ayant prouvé un potentiel thérapeutique dans des modèles acellulaires ou cellulaires (méthodes alternatives à l'utilisation des animaux comme nous le rappelle la règle des 3 R's), pourront alors faire l'objet d'une évaluation et démontrer leur potentialité sur une cirrhose compensée à enrayer celle-ci et empêcher le processus de décompensation.

L'insuffisance hépatique associée au stade cirrhotique peut impacter les paramètres pharmacocinétiques des traitements administrés puisque les capacités du foie à synthétiser, métaboliser et éliminer sont amoindries. Il conviendra donc de réaliser des études de pharmacocinétiques des produits administrés seuls ou en combinaison dans les modèles pathologiques.

De plus, il ne sera effectué sur les animaux que le nombre strict de prélèvements sanguins, en volume et en fréquence, compatibles avec la physiologie de l'animal. Les animaux seront sous observation quotidienne et aucun animal en détresse ou en souffrance ne sera maintenu dans cet état, il serait euthanasié par une méthode humaine adaptée le cas échéant. Par ailleurs, l'hébergement des animaux pendant la phase d'acclimatation et pendant l'expérimentation sera faite avec enrichissement du milieu afin d'améliorer leur bien-être. Notre connaissance du modèle ou de modèles hépatotoxiques proches, nous permet de définir des points limites éthiquement et scientifiquement acceptables, en tenant compte des objectifs de l'étude. A terme, nos travaux pourraient ouvrir de nouvelles voies de traitement de certaines formes de maladies hépatiques chroniques, aujourd'hui ce besoin médical est clairement établi. Ce projet engagera des rats et dans un nombre estimé à 2260 individus pour la durée que couvrira ce projet. Le nombre d'animaux utilisé dans chaque lot de chaque procédure est réduit, il correspond au seuil minimal qui puisse nous permettre d'apprécier, avec nos moyens techniques et en fonction de la variabilité inter individus, les effets désirés.

14340 A ce jour seulement 1 à 2 médicaments sur 10000 entrent en phase clinique et seront mis sur le marché. Actuellement, l'accent est donc mis sur l'identification et la validation de biomarqueurs qui présentent des intérêts majeurs pour la Recherche et le Développement de molécules thérapeutiques, dans la mise au point de médicaments innovants et dans le développement des médecines personnalisées. Un biomarqueur est une substance trouvée dans le sang, les fluides ou les tissus et qui fournit une mesure de l'état biologique normal, pathologique ou d'une réponse à un médicament ou une autre substance étrangère.

L'objectif de notre projet est donc d'identifier et/ou de valider des biomarqueurs précoces de toxicité tissulaire ou d'organe à l'aide de modèles animaux mimant le processus complet le plus proche de l'Homme (la toxicité étant induite par une molécule chimique ou biologique connue pour ses effets toxiques spécifiques). A travers une approche expérimentale basée sur la recherche de biomarqueurs circulants accessibles de manière peu ou non invasive (sang, salive, urine, fèces etc.), le potentiel de toxicité de molécules sera évalué de manière précoce à des fins de prédiction, diagnostic ou de pronostic.

Un biomarqueur étant spécifique de certains types d'atteintes (fonction ou tissu), il nécessite de ce fait de co-signer (valider) la lésion dans un certain nombre d'espèces animales utilisées en expérimentation ainsi que chez l'Homme. Il doit donc pouvoir être utilisé pour faire le lien entre les études non cliniques et cliniques (biomarqueur dit « translationnel »).

C'est pourquoi notre projet englobe des espèces rongeurs et non-rongeurs, espèces obligatoires pour la soumission aux autorités réglementaires. Il couvre l'utilisation d'au maximum 2160 animaux dont 72 primates non-humains, 72 chiens, 1152 rats et 864 souris (incluant les souris génétiquement modifiées) sur une période de 3 ans.

L'identification et/ou la validation de nouveaux biomarqueurs comme indicateurs de toxicité précoce permettra en première intention de sélectionner les candidats médicaments les plus prometteurs et/ou d'arrêter plus précocement le développement de molécules ayant un profil toxicologique non acceptable au regard de l'indication thérapeutique proposée. A plus long terme, les biomarqueurs

les plus pertinents pourront être utilisés comme outils futurs d'adaptation des essais cliniques par exemple règles d'arrêt de diagnostic/pronostic chez l'Homme.

Les études expérimentales de ce projet sont réalisées par du personnel formé et compétent. Le nombre d'animaux par groupe et le nombre de groupes sont basés sur les lignes directrices internationales telles que celles d'ICH (« International Conference on Harmonisation ») qui sont appliquées pour les études de toxicologie générale et également sur des bases scientifiques afin d'obtenir un effectif suffisant permettant l'interprétation des effets rares et significatifs. De plus, le contenu de ces études intègre les impératifs éthiques tels que les modalités d'administration et de prélèvement, l'hébergement et l'enrichissement du milieu spécifique pour chaque espèce étudiée mais aussi la prévention de toute douleur, détresse ou inconfort chez l'animal. Enfin, la réutilisation d'animaux (réformés, issus d'autres projets, pour la formation et le maintien des compétences...) ou le placement dans certains cas, s'effectue dans le cadre de nos procédures internes et après approbation vétérinaire contribuant ainsi à l'application de la règle des 3R raffinement, réduction, remplacement.

14341 L'objectif de ce projet vise à sélectionner des vecteurs afin de moduler l'expression de gènes principalement dans le foie par la technique d'injection hydrodynamique.

Une maladie hépatique chronique représente un problème majeur pour la santé dans le monde. Les modèles de recherche animale sont des outils essentiels dans l'étude des maladies du foie et ont permis de répondre à des questions complexes relatives à la régénération du foie, à l'inflammation hépatique, à la stéatose et au cancer du foie. Un nombre substantiel de ces modèles animaux s'appuie sur la modification génétique des cellules du foie. Par conséquent, des outils efficaces pour manipuler l'expression des gènes dans les hépatocytes sont utiles. Les méthodes établies telles que la sélection de souches de souris génétiquement modifiées ou la génération de vecteurs viraux pour l'infection par les hépatocytes prennent beaucoup de temps, posent des problèmes de sécurité ou génèrent une faible expression transgénique dans les hépatocytes *in vivo*. L'injection hydrodynamique dans la veine caudale (HTVI) est une méthode alternative pour la transfection *in vivo* des hépatocytes qui est facile, rapide et économique pour étudier la fonction des gènes dans le foie.

Pour cette technique, un vecteur portant la séquence d'ADN souhaitée est injecté à la veine caudale correspondant à 10% du poids corporel de l'animal en 5 à 10 secondes.

La délivrance génique hydrodynamique utilise une force hydrodynamique générée par une injection sous pression d'un volume important de solution d'ADN dans le vaisseau sanguin, de manière à perméabiliser l'endothélium capillaire et à générer des « pores » dans la membrane plasmique des cellules du parenchyme environnant, à travers lesquelles les macromolécules d'intérêt peuvent atteindre l'intérieur de la cellule.

Pour obtenir une intégration génomique stable, la méthode peut être combinée à des vecteurs à base de transposon. Ce système intervient dans la recombinaison de vecteurs cibles avec des sites de recombinaison génomique catalysés par une transposase.

Dans ce projet, nous nous attacherons à sélectionner des vecteurs ADN plasmidique codant pour une molécule fluorescente afin de suivre son évolution car il est primordiale de connaître le taux de transfection en fonction des constructions utilisées.

A plus long terme, nous utiliserons le ou les vecteurs sélectionnés dans ce protocole afin de faire soit surexprimer des pro-oncogènes ou sous exprimer des suppresseurs de tumeurs pour l'établissement de nouveaux modèles murins de cancer.

Ce protocole sera réalisé au cours des 5 années couverte par ce projet avec 1530 souris.

Les procédures utilisées s'appuient sur une étude de la littérature scientifique et sont adaptées afin d'optimiser le nombre d'animaux à engager dans les protocoles expérimentaux. En effet, en respect de la règle du raffinement, un ajustement strict du nombre d'animaux est effectué afin de maximiser les informations recueillies lors des expériences. Les procédures réalisées sur les animaux sont d'une gravité légère et il n'est pas envisagé que ce protocole induise des signes évident de douleur.

Cependant les effets indésirables plutôt d'inconfort qui pourraient être rencontrés pendant les minutes suivant l'injection seront contrecarrés par l'utilisation de dispositifs de chauffage (lampe ou tapis chauffant) pour améliorer la récupération de l'animal.

Les points limites sont décrits en 3.4.13, une surveillance accrue sera pratiquée dans le cas où une dégradation de l'état général des animaux est constatée. De plus, il ne sera effectué sur les animaux que le nombre strict de prélèvements sanguins, en volume et en fréquence, compatibles avec la physiologie de l'animal. Les animaux seront sous observation quotidienne et aucun animal en détresse ou en souffrance ne sera maintenu dans cet état, il serait euthanasié par une méthode adaptée le cas échéant.

14342 Le cancer chez les enfants et les adolescents est un événement rare qui représente environ 1% de l'ensemble des cancers. Bien que rares, ils constituent la deuxième cause de mortalité entre 1 et 14 ans après les accidents et c'est la première cause de décès par maladie pour cette tranche d'âge. Actuellement, les taux de guérison restent très faibles pour certaines formes de cancer avec moins de 10% pour les tumeurs cérébrales de haut grade. Environ 30% des patients atteints de neuroblastome et sarcome d'Ewing restent en échec thérapeutique malgré des protocoles de radiothérapie et/ou de chimiothérapie à haute dose, qui peuvent être associés à une importante toxicité.

Compte tenu de la rareté du matériel tumoral, le développement de modèles de xénogreffes à partir de tumeurs issues de patients est indispensable afin de pouvoir obtenir les modèles expérimentaux les plus adaptés et les mieux caractérisés, ceci afin de comprendre le développement de ces maladies en échec thérapeutique mais également de permettre l'identification de nouveaux médicaments ou pistes thérapeutiques.

Un premier projet a déjà permis de développer une centaine de modèles de xénogreffes dérivées de patients sur plus de 260 échantillons greffés. Certains de ces modèles ont permis de mieux comprendre le fonctionnement de différents types de cancer. Ce projet s'inscrit dans la continuité de ces résultats. Il permettra de développer des modèles indispensables également pour mettre en relation le diagnostic du patient et sa rechute.

Nous développons en parallèle des modèles alternatifs de type culture cellulaire pour soutenir nos hypothèses qui devront ensuite être validées *in vivo*, comme par exemple l'efficacité anti-tumorale d'un médicament. Néanmoins, ces modèles alternatifs ne nous permettent pas encore de pouvoir appréhender le comportement tumoral dans son micro- environnement qui peut être exploré dans modèles orthotopiques (xénogreffe dans le site originel du matériel tumoral) mais également la réponse au traitement qui implique souvent différents systèmes au sein de l'organisme et qui nécessite principalement des modèles de xénogreffes sous-cutanées ou orthotopique. Pour limiter la douleur engendrée par le développement de la tumeur, les animaux pourront recevoir un antalgique adapté ainsi qu'une surveillance clinique très resserrée et attentive. D'après notre expérience passée, le taux de prise tumorale avoisine 50 % toutes tumeurs confondues mais il reste très variable, même au sein d'un même type tumoral. Dans ce contexte et afin d'obtenir un panel de modèles reflétant la variabilité inter-tumorale pour les différents types tumoraux, nous grefferons la totalité des biopsies tumorales qui seront mises à notre disposition. D'après notre expérience avec le projet précédent (un programme de recherche sur les tumeurs pédiatriques), le nombre d'animaux utilisés par tumeur a pu être diminué. En effet, pour chaque tumeur, nous grefferons au maximum 6 souris sous anesthésie 3 orthotopique et 3 sous-cutanées au lieu de 10 dans le premier projet, Puis, une seule tumeur par modèle sera transplantée consécutivement trois fois de manière à évaluer leur stabilité et caractériser ces xénogreffes dérivées de patients en vue d'exploration fonctionnelle ou thérapeutique. Toutes les interventions chirurgicales seront effectuées sous anesthésie générale et un antidouleur supplémentaire pourra être ajouté en postopératoire. Ce projet porte le nombre maximum théorique d'animaux utilisés à 3000 soit 600 par an (si toutes les xénogreffes prennent à 50%).

14343 Ce projet s'inscrit dans le cadre d'un programme de recherche destiné à identifier de nouvelles molécules permettant de traiter la cirrhose hépatique.

Cette pathologie est définie par l'accumulation excessive de fibrose conduisant à la dégénérescence du foie. Suivant le stade, elle est difficilement réversible. L'incidence annuelle de la cirrhose du foie en France est estimée à 150 à 200 cas par million d'habitants avec un nombre de décès d'environ 15000 par an. C'est une des complications majeures des maladies chroniques du foie, qu'elles soient d'origine alcoolique, virale, métabolique ou liée à l'exposition à certains médicaments. La cirrhose constitue un terrain propice au développement des cancers primitifs du foie car elle s'accompagne d'une augmentation de la régénération anarchique des cellules hépatiques et donc du risque d'altérations génétiques. Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est de loin le cancer plus fréquent et il se développe dans plus de 90 % des cas sur une cirrhose, qu'elle qu'en soit l'origine.

La progression de la fibrose hépatique chez un individu est difficile à évaluer. Il s'agit d'un processus chronique qui chez une majorité des patients évolue vers la cirrhose dans un délai de 15 à 20 ans. La cirrhose se définit selon deux stades, la phase compensée, asymptomatique et détectée grâce à des anomalies caractéristiques lors de l'examen clinique, et la phase décompensée où la défaillance de l'organe entraîne l'apparition de complications. Les complications de la cirrhose sont très graves (hémorragies digestives liées à l'hypertension portale avec rupture de varices œsophagiennes et/ou gastriques, ascite, encéphalopathie liée à l'accumulation d'urée au niveau sanguin et pathologie hépatorénale) et en l'absence de prise en charge conduisent irrémédiablement au décès du patient.

A ce jour, aucune molécule n'a reçu d'autorisation de mise sur le marché pour traiter en soi la cirrhose et permettre de bloquer le processus qui conduit à la décompensation (stade irréversible) de la cirrhose. Aussi, plusieurs voies de recherche et de développement sont en cours pour palier à ce déficit. Afin d'étudier et d'étayer nos hypothèses lors du développement de nos molécules, il nous sera inévitable d'avoir recours à des modèles animaux mimant au mieux la pathologie humaine puisqu'actuellement aucune méthode alternative n'est disponible pour évaluer l'efficacité des molécules candidates.

La cirrhose est la résultante d'agressions hépatiques chroniques qui peuvent avoir diverses origines et qui peuvent se cumuler. Ainsi, les désordres métaboliques et notamment l'insulinorésistance, le stress oxydatif (tabagisme, alcoolisme) et les infections sont autant de composantes qui rendent la pathologie humaine difficilement transposable au modèle animal. Nous nous proposons de mettre en œuvre un modèle s'approchant davantage de la pathologie humaine que la majorité des modèles unifactorielles en prenant en compte la notion de multi-hit de la maladie. Ainsi, les animaux seront exposés de manière séquentielle à plusieurs agents favorisant la mise en place et le développement de la maladie.

Dans un premier temps, les animaux recevront des régimes spéciaux (riche en graisse et en sucre) qui permettront le développement d'un syndrome métabolique (diabète et dyslipidémie) nous associerons l'administration de thioacétamide (TAA) afin d'induire un stress oxydatif important. Enfin, nous administrerons du lipopolysaccharide (LPS) qui viendra mimer la composante infectieuse et ainsi compléter le panel multifactoriel d'atteinte hépatique. Cette dernière phase permettrait d'accélérer le processus de mécanisme de décompensation de la pathologie.

Une fois le modèle mis en place avec une phase clairement définie de cirrhose compensée et une phase de décompensation, les molécules ayant prouvé un potentiel thérapeutique dans des modèles acellulaires ou cellulaires (méthodes alternatives à l'utilisation des animaux comme nous le rappelle la règle des 3 R's), pourront alors faire l'objet d'une évaluation et démontrer leur potentialité sur une cirrhose compensée à enrayer celle-ci et empêcher le processus de décompensation.

L'insuffisance hépatique associée au stade cirrhotique peut impacter les paramètres pharmacocinétiques des traitements administrés puisque les capacités du foie à synthétiser, métaboliser et éliminer sont amoindries. Il conviendra donc de réaliser des études de pharmacocinétiques des produits administrés seuls ou en combinaison dans les modèles pathologiques.

De plus, il ne sera effectué sur les animaux que le nombre strict de prélèvements sanguins, en volume et en fréquence, compatibles avec la physiologie de l'animal. Les animaux seront sous observation quotidienne et aucun animal en détresse ou en souffrance ne sera maintenu dans cet état, il serait euthanasié par une méthode humaine adaptée le cas échéant. Par ailleurs, l'hébergement des animaux pendant la phase d'acclimatation et pendant l'expérimentation sera faite avec enrichissement du milieu afin d'améliorer leur bien-être. Notre connaissance du modèle ou de modèles hépatotoxiques proches, nous permet de définir des points limites éthiquement et scientifiquement acceptables, en tenant compte des objectifs de l'étude. A terme, nos travaux pourraient ouvrir de nouvelles voies de traitement de certaines formes de maladies hépatiques chroniques, aujourd'hui ce besoin médical est clairement établi. Ce projet engagera des rats et dans un nombre estimé à 1624 individus pour la durée que couvrira ce projet. Le nombre d'animaux utilisé dans chaque lot de chaque procédure est réduit, il correspond au seuil minimal qui puisse nous permettre d'apprécier, avec nos moyens techniques et en fonction de la variabilité inter individus, les effets désirés.

14344 La capacité à estimer le temps est cruciale pour l'adaptation des organismes à leur environnement. Elle permet, entre autres, de mieux se préparer à agir et de planifier des conduites en prévision d'événements. Comment la durée de stimuli ou d'actes moteurs dans une gamme de temps relativement brève (de quelques centaines de milliseconde à quelques secondes) est-elle représentée dans le cerveau ? Cette question est actuellement au centre de nombreux travaux qui désignent un système sous-cortical, les ganglions de la base, comme un composant essentiel du réseau de structures cérébrales impliquées dans le traitement des informations temporelles. En particulier, diverses pathologies neurologiques et psychiatriques associées à un dysfonctionnement des ganglions de la base (maladie de Parkinson, troubles compulsifs) se caractérisent par des anomalies comportementales susceptibles de refléter, au moins en partie, un défaut de prise en compte du contexte temporel, aboutissant à un ralentissement moteur ou à une réactivité inadéquate aux sollicitations de l'environnement. Il est également admis que la neurotransmission dopaminergique régule les fonctions du striatum et qu'une atteinte de cette influence modulatrice est la cause de déficits de l'estimation du temps et de l'organisation séquentielle des actions.

Notre projet est centré sur l'étude des mécanismes neuronaux qui sous-tendent l'estimation du temps au niveau du striatum qui est la principale structure des ganglions de la base. Nos objectifs sont les suivants : (1) identifier, à l'échelle neuronale, les mécanismes striataux de traitement des informations temporelles; (2) déterminer si une altération expérimentale de l'innervation dopaminergique du striatum interfère avec la capacité à estimer le temps.

Afin de tenir compte des spécialisations anatomiques et fonctionnelles propres au cerveau du primate, ces travaux seront réalisés chez le singe. On sait que certaines régions associatives du cortex cérébral (aires préfrontales et pariétales) du primate atteignent un degré de différenciation sans commune mesure avec le cerveau du rongeur. Ces régions, connues pour intervenir dans l'estimation du temps, sont une source importante d'afférences au striatum. Par ailleurs, les contraintes imposées par le contexte temporel s'exercent non seulement sur les mouvements du corps, mais aussi sur l'orientation du regard qui joue un rôle fondamental dans le répertoire comportemental des primates, notamment dans les interactions sociales. Une mise en jeu spécifique des régions fronto-pariéto-striatales impliquées dans la perception et le traitement des informations temporelles peut donc participer aux mécanismes neuronaux qui sous-tendent les mouvements d'orientation du regard propres aux primates, qui sont parmi les plus rapides et les plus précis que produit le cerveau des mammifères.

Bien que trois singes soient inclus dans notre projet de recherche, les expériences ne concerneront que deux d'entre eux si les données acquises s'avèrent suffisamment fiables au plan scientifique pour ne pas avoir à inclure de troisième sujet. Nos expériences électrophysiologiques nécessiteront d'habituer des macaques rhésus (*Macaca mulatta*) à des conditions de restriction des mouvements de la tête pour garantir la stabilité des enregistrements neuronaux au niveau de structures profondes du cerveau (striatum). De telles contraintes sont difficilement applicables avec des singes plus primitifs (marmouset, singe-écureuil ou singe capucin) chez lesquels les restrictions de mouvement

sont difficiles à tolérer, ces espèces étant spontanément beaucoup plus actives que les macaques. Ainsi, une entrave à leur mobilité risquerait de compromettre les aptitudes mnésiques et attentionnelles requises dans une tâche d'estimation temporelle. Ce sont donc des contraintes méthodologiques (couplage de tests comportementaux et d'enregistrements neuronaux nécessitant une immobilisation de la tête) qui nous font préférer le macaque à d'autres espèces de primate non humain. L'inactivation expérimentale des systèmes neuronaux dopaminergiques prévue dans la partie finale de notre projet sera réalisée chez les mêmes singes utilisés pour l'électrophysiologie. Cette dernière procédure expérimentale visera à mimer le dysfonctionnement observé dans la maladie de Parkinson (déficience dopaminergique) afin d'examiner les conséquences sur la capacité des animaux à estimer le temps. La proximité phylogénétique du modèle d'étude et les protocoles de test mis en œuvre chez le macaque, comparables à ceux employés en psychologie de la perception du temps chez l'homme, rendront les résultats de nos recherches pertinents pour une extrapolation aux situations pathologiques rencontrées en clinique humaine. L'inactivation expérimentale de la neurotransmission dopaminergique par injection systémique ou intracérébrale de neurotoxique est largement employée chez le rongeur (souris, rat) et le singe (marmouset, macaque) pour mieux caractériser les troubles du comportement et les corrélats électrophysiologiques et biochimiques induits par le déficit en dopamine. L'avantage chez le macaque est de permettre de combiner ce type d'inactivation au recueil d'activités neuronales unitaires dans des situations comportementales compatibles avec l'analyse des processus d'estimation temporelle.

La mise en place de ce projet prend en considération, autant que faire se peut, l'application de la règle des 3Rs. Il est impossible de remplacer le modèle singe par un modèle "simplifié" (*in vitro*, *in silico*) incompatible avec l'objectif de notre projet qui oblige à travailler chez l'animal vigile, qui interagit activement avec son environnement. Il n'existe pas de solution permettant de remplacer le modèle d'étude sur lequel nous proposons de travailler. Nous avons réduit le nombre d'animaux en tenant compte de la nécessité d'aboutir à des résultats valides au plan scientifique. Bien que trois singes soient inclus dans le projet, il est possible que nous n'ayons à en utiliser que deux, si les résultats et leur interprétation sont probants au plan scientifique. La mise en œuvre de deux procédures expérimentales sur les mêmes animaux permet d'optimiser les données recueillies sur chaque animal. Tous les protocoles décrits dans ce projet répondent au constant souci de limiter les contraintes et les éventuelles souffrances subies par les animaux en mettant en œuvre tous les moyens disponibles (adaptation des protocoles, surveillance et soins constants, assistance thérapeutique).

14345 Certaines pathologies s'accompagnent du développement de douleurs chroniques, persistant en l'absence d'atteinte tissulaire. Ces douleurs, dont l'origine est diverse et qui peuvent atteindre jusqu'à 20 % de la population sont extrêmement invalidantes pour la personne qui les endure et présentent un coût socio-économique extrêmement important.

De façon surprenante, le développement de ces douleurs chroniques est sujet à une large variabilité au sein d'une population donnée, et les mécanismes qui favorisent le développement de ces douleurs restent très peu connus.

Plusieurs études pilotes suggèrent qu'une altération de la perméabilité des neurones de la moelle épinière à certains ions, tels que le potassium joue un rôle déterminant dans l'intégration des stimuli nociceptifs. Ce projet vise à caractériser les différents types de courants potassiques impliqués dans le traitement des informations douloureuses au niveau de la moelle épinière.

La réalisation de ce projet nécessite l'utilisation d'animaux transgéniques dans lesquels les interneurons inhibiteurs expriment une protéine fluorescente. 6 groupes de 30 animaux chacun seront réalisés dont la une partie subira une opération visant à induire une douleur modérée sur la paume de la patte arrière gauche, le restant des animaux servant de témoins. Les animaux seront sacrifiés à différents temps après la chirurgie (2 ou 10 jours) et la moelle épinière prélevée en vue d'une caractérisation des propriétés électrophysiologiques des neurones de la moelle épinière.

Ce projet permettra de mieux comprendre les mécanismes qui président à la transformation des douleurs aiguës en douleurs chroniques.

La réalisation de ce projet dans son ensemble nécessite l'utilisation de 180 souris sur une durée de 5 ans. La souris servira de modèle d'étude car c'est un modèle bien caractérisé pour l'étude du comportement douloureux et pour lequel les souches d'animaux transgéniques sont disponibles.

Tout au long de ce projet, tous les efforts seront faits pour satisfaire dans la mesure du possible à la règle des 3R (réduire, remplacer, raffiner)

- Dans cette étude, le nombre d'animaux utilisés est réduit au minimum requis pour une interprétation statistique des résultats obtenus, en tenant compte de l'hétérogénéité inter-individuelle et de la diversité des neurones de la moelle épinière). Le nombre de souris utilisées dans chacun des groupes expérimentaux ne dépassera pas ainsi 30 animaux par groupe.

- Le recours au modèle animal est indispensable car aucun modèle *in vitro* (cellules ou tissus) ne permet de reproduire l'organisation des réseaux spinaux dans les conditions naïves et/ou pathologiques.

- L'ensemble des chirurgies sont réalisées sous anesthésie générale et une analgésie post-chirurgie est mise en place pour l'ensemble des animaux. Les animaux feront l'objet d'une surveillance renforcée, et les conditions d'hébergement des animaux sont optimisées de façon à optimiser le bien-être des animaux (milieu enrichi, hébergement en cage collective pour éviter les stress d'isolement). La douleur attendue pour ce modèle est une douleur d'intensité modérée. Les animaux sont surveillés attentivement si une souris montre des signes de douleur importante, elle sera euthanasiée immédiatement pour interrompre cette souffrance. Si une souris présente des signes de mal être pouvant être résolu par un traitement vétérinaire, il sera mis en place immédiatement.

14346 La polymicrogyrie est une malformation relativement fréquente du cortex cérébral dans laquelle il existe un excès de circonvolutions du cerveau. Les individus atteints par cette pathologie ont des anomalies neurologiques qui peuvent parfois être graves. Chez un patient présentant ce type de malformation, nous avons identifié une anomalie de deux gènes dans la région chromosomique 1p36. Cette région est connue pour être impliquée dans la polymicrogyrie mais le gène responsable n'a pas encore été indentifié. L'objectif de ce projet est donc d'identifier le gène de la région 1p36, dont la mutation entraîne une polymicrogyrie.

Pour ce faire, l'expression de ces deux gènes sera perturbée *in utero* dans le cerveau d'embryons d'un modèle animal, ici en l'occurrence le rat dans le but d'en évaluer les conséquences sur le développement cérébral.

Pour l'hébergement, les cages avec de la litière propre, enrichies avec un dôme en carton, seront placées dans un environnement calme. L'eau et la nourriture sont données *ad libitum*. Par ailleurs, nous surveillons l'aspect général des animaux afin de déceler toute douleur ou mal-être éventuel de nos animaux. Nous avons veillé à scrupuleusement respecter la règle des 3R. Remplacement aucune méthode alternative à l'utilisation d'animaux vivants n'est susceptible de répondre aux objectifs du projet (nécessité d'étudier la migration neuronale pendant le développement). Réduction : ce projet utilisera le nombre minimal d'animaux nécessaires, soit 48 embryons et 4 rates gestantes (52 animaux). Une rate gestante porte en moyenne 12 embryons. Nous prévoyons d'injecter 4 rates afin de disposer de 48 embryons. Nous avons calculé que ce nombre d'animal permettra de répondre à la question posée dans ce projet. Raffinement : cet objectif sera rempli en nous assurant que les animaux ne souffrent pas pendant les procédures expérimentales prévues. A cet effet, l'anesthésie (sévoflurane) sera accompagnée d'une analgésie au site d'incision (lidocaïne-pilocaine 5%) ainsi que de buprénorphine en pré-opératoire et post-opératoire. En complément, nous avons prévu d'y associer un anti-inflammatoire (carprofène 5mg/kg).

14347 L'une des premières prises de conscience des effets majeurs de la pollution atmosphérique sur la santé a eu lieu lors d'un épisode survenu à Londres pendant l'hiver 1952 durant 4 jours, un épais brouillard s'est abattu sur la ville, et 4000 décès supplémentaires (par rapport à la même période les années précédentes) ont été enregistrés, plus de la moitié étant pour causes respiratoires.

L'Organisation Mondiale de la Santé a depuis estimé que, pour la seule année 2012, 3,7 millions de morts survenaient prématurément du fait de la pollution atmosphérique, et a déclaré, en 2014, la pollution atmosphérique comme représentant le plus large risque environnemental pour la santé.

L'un des principaux challenges dans le contexte de l'étude des effets sur la santé de la pollution atmosphérique résulte en effet de l'extrême complexité du mélange atmosphérique à n'importe quel point de l'espace, des milliers d'espèces de polluants ayant une diversité chimique énorme coexistent, produisant ainsi une réactivité chimique instantanée qu'il est impossible d'estimer avec les méthodes classiques de la chimie organique. De plus, cette réactivité est hautement modulée avec le temps du fait de la transformation rapide de nombreuses espèces sur des échelles de temps allant de la seconde à la minute. La pollution atmosphérique est ainsi constituée d'un mélange complexe de plusieurs milliers de composants qui évoluent dans le temps. Du point de vue de la santé, les constituants de la pollution atmosphérique les plus souvent associés à des effets délétères sont les polluants gazeux (comme l'ozone, le monoxyde de carbone, les oxydes d'azote, ...) et les particules. Cependant, et comme évoqué plus haut, la pertinence d'une telle approche basée sur l'étude des composants isolés de la pollution est entamée du fait de l'absence de considération de la synergie suspectée entre les différents constituants de la pollution atmosphérique. Nous disposons d'un système unique permettant de soumettre des animaux à des atmosphères polluées complexes, système permettant d'aborder de manière pertinente et réaliste la problématique des effets de ces pollutions sur la santé.

Nous nous intéressons particulièrement aux effets de la pollution atmosphérique sur l'évolution de la mucoviscidose, pathologie pour laquelle aucun traitement n'est disponible à ce jour, en utilisant un modèle murin. Nos objectifs consistent à déterminer l'impact d'une pollution atmosphérique complexe sur la descendance de souris exposées lors de la gestation et à évaluer les conséquences respiratoires d'expositions répétées de souris adultes

Nous travaillerons ainsi sur 3 atmosphères modèle, représentatives de la pollution atmosphérique présente dans une zone urbaine européenne moyennement polluée (Paris), une zone urbaine très polluée (Pékin) et une zone urbaine européenne du futur (Méditerranée).

Les souris seront exposées aux différents atmosphères (pic de pollution de 48 heures, 10 jours continus pendant la gestation ou 1 semaine par mois à l'âge adulte) grâce au couplage de la chambre de simulation atmosphérique avec une armoire de stabulation permettant l'hébergement des souris dans leur cage ventilée, sans modification de leur environnement proche. Une partie de l'armoire a été isolée de façon à y faire entrer de l'air non pollué (filtré à l'entrée).

Tout au long de ces études, nous respecterons la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). Nous limiterons ainsi le projet aux seules expériences indispensables, tout en tenant compte des contraintes liées à l'utilisation de l'enceinte d'exposition. En effet, un seul type d'atmosphère peut être généré en même temps, ce qui implique la répétition des groupes "Air non pollué" pour chaque lot expérimental. À noter aussi qu'en fonction du calendrier des expériences, des mâles seront utilisés uniquement pour l'accouplement et ne subiront aucune exposition aux atmosphères polluées

Le modèle murin choisi est celui le plus couramment utilisé dans la communauté scientifique de la mucoviscidose. Puisque les objectifs de notre étude sont d'évaluer les effets de la pollution atmosphérique sur le cours de la maladie mucoviscidose, il est donc très pertinent de vouloir utiliser un tel modèle. Le projet prévoit le recours à un nombre d'animaux aussi limité que possible 1080 souris au total. Toutes les souris seront suivies afin d'évaluer leur comportement et par conséquent leur bien-être. Un suivi clinique des animaux sera réalisé tout au long des expériences, avec mise en place de points limites précis (perte d'activité, difficultés locomotrices, difficultés à respirer) qui permettront d'éviter toute souffrance. Pour enrichir le milieu, les cages auront de la sciure de bois, du coton, et des bouts de bois. Le modèle animal ne peut pas être actuellement remplacé par des tests alternatifs pour l'étude des effets explorés.

14348 La prise en charge thérapeutique des douleurs aiguës ou chroniques (e.g. douleurs neuropathiques associées au diabète ou aux traitements par chimiothérapies) constitue un challenge majeur. En effet, les molécules antalgiques utilisées à l'heure actuelle ne sont pas suffisamment efficaces pour

soulager les patients de façon acceptable et/ou présentent des effets indésirables trop importants (e.g. addiction/dépendance).

Le développement de nouveaux médicaments dans cette aire thérapeutique est particulièrement difficile en raison du manque de prédictivité des modèles animaux disponibles (principalement rongeurs). Ainsi, de nombreuses molécules présentant un profil d'efficacité prometteur dans des modèles rongeurs s'avèrent souvent parfaitement inefficaces lors des essais chez l'homme. De nombreux travaux pointent donc l'importance de développer des modèles animaux qui soient plus proches de l'homme.

L'objectif de ce projet est de développer un modèle permettant d'évaluer les propriétés analgésiques de nouvelles substances en étudiant les seuils de réponse à une stimulation thermique chez le primate non-humain.

Le nombre prévisionnel maximum d'animaux est de 80 primates.

La conception de ce projet prend en compte la règle des 3R.

Remplacement dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez le primate non humain car il n'existe pas de méthode de substitution (*in vitro* ou *in silico*) pour évaluer les effets d'une nouvelle molécule sur la sensibilité thermique de la peau. Or, avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité, la toxicité et la pharmacocinétique d'un candidat médicament. A ce jour, le primate non humain est l'espèce qui est la plus adaptée à ce type de modèle d'étude.

Réduction Un nombre minimal et suffisant d'animaux par groupe est utilisé afin d'analyser de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et d'effectuer des analyses statistiques.

Raffinement dans ce projet, le raffinement sera obtenu par

- . la familiarisation des animaux aux techniques de manipulation et au matériel qui sera utilisé pour les tests

- . la mise en pratique du renforcement positif (distribution de récompenses alimentaires) lors des entraînements et des tests

- . le recours à des procédures les moins invasives possibles

- . le suivi d'éventuels signes cliniques

- . Apparition de signes locaux au niveau des sites de stimulation thermique

- . la détermination des points limites

- . la réduction du volume sanguin prélevé grâce à l'amélioration de la sensibilité des méthodes d'analyse.

14349 L'élevage porcin biologique, bien qu'en développement reste très minoritaire; environ 1.5% des truies sont élevées sous label biologique en France.

Cela s'explique en partie, parce que ce mode de production pose encore de nombreuses questions techniques et scientifiques.

Par exemple, les lignées de porcs actuellement disponibles ne permettent pas d'obtenir des performances optimales, on observe notamment une mortalité des jeunes plus élevée en systèmes AB qu'en production conventionnelle.

Dans le cadre d'un projet de recherche, nous souhaitons sélectionner des truies plus adaptées au système de production biologique.

Pour ce programme de sélection nous devons disposer de l'ADN pour génotyper les truies reproductrices, il est obtenu après une prise de sang (1 tube de 4 ml).

Toutes les femelles du programme de sélection seront prélevées; 50 femelles par génération sur 3 générations soit 150 truies maximum.

La règle des 3Rs est prise en compte

-remplacer : il s'agit de génotyper les truies, les prélèvements sanguins sont nécessaires

-réduire : toutes les femelles sont prélevées mais cette prise de sang pourra aussi permettre des dosages physiologiques ou sanitaires sans prise de sang supplémentaires

-raffiner, les conditions d'élevage biologique prennent en compte le bien-être animal, elles imposent la mise à disposition de surfaces supérieures au décret 2013-118 relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques, d'épaisses litières de paille et l'accès à des courettes extérieures. Les prises de sang sont réalisées par du personnel hautement qualifié, en moins de 30 secondes par animal.

14350 Ce projet a pour but de mettre en place la technique de mesure de la force musculaire *in vivo* chez la souris. Cette technique une fois mise en place sera nécessaire à la réalisation d'autres projets qui visent à tester de nouveaux candidats médicament qui pourraient être utilisés pour soigner ou réduire de façon significative les symptômes de patients souffrants de Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD). Elle permettra également d'étudier différentes myopathies ou atteintes musculaires graves, de comprendre les mécanismes de ces pathologies, de mettre en évidence les gènes impliqués, et in fine de tester de nouveaux traitements. L'allongement de la durée de vie et le vieillissement des populations amène également à étudier plus en détail le vieillissement du muscle qui contribue à la précarisation des personnes âgées. Cette technique *in vivo* pourra se substituer en partie à la méthode de mesure *in situ*, déjà développée dans notre institut, plus invasive et nécessitant la mise à mort des animaux en fin de procédure. Le modèle animal ne peut pas être REMPLACÉ dans ce projet étant donné qu'il vise à étudier la fonction musculaire dans un organisme vivant.

Ce protocole requiert la maîtrise de l'utilisation d'un équipement qui mesure la force musculaire ainsi que du positionnement de l'animal sur cet équipement. La mise en place nécessite d'utiliser des animaux vivants anesthésiés afin de pouvoir mesurer la force musculaire. Des souris "sauvages" (c'est à dire non génétiquement modifiées) seront testées dans un premier temps afin d'atteindre une bonne compétence du protocole. Dans un deuxième temps, des souris mutantes qui reproduisent certains éléments de la pathologie humaine DMD seront utilisées pour ce projet afin de s'entraîner à détecter la diminution de la force musculaire chez des animaux malades. Pour finir, des souris sauvages seront utilisées afin de réaliser une étude dans le temps de l'effet de l'âge sur la force musculaire. En effet, il s'avère important, étant donné le vieillissement des populations, d'étudier également la force musculaire chez les sujets âgés, certaines pathologies musculaires pouvant se développer avec l'âge.

REDUCTION : nous estimons le nombre de souris nécessaire pour ce projet à 80 souris : 60 souris "sauvages" adultes et 20 souris mutantes. 40 souris sauvages (20 mâles et 20 femelles) seront nécessaires pour valider la technique. La DMD affectant les garçons, nous utiliserons des souris mdx mâles. Pour le protocole de vieillissement 20 souris (10 mâles et 10 femelles) seront nécessaires. Le nombre de souris pourra être diminué dans le cas où la technique serait bien maîtrisée après entraînement sur un nombre inférieur de souris. Cependant afin de réaliser efficacement les projets suivants, visant notamment à tester de nouveaux médicaments sur la DMD et d'autres pathologies musculaires, il est indispensable que la technique soit maîtrisée et que l'on ait réussi à détecter une anomalie de la force musculaire chez les souris mutantes, porteuse d'une myopathie.

RAFFINEMENT : les souris seront anesthésiées par anesthésie gazeuse tout au long du protocole. La méthode est non invasive, elle permet de répéter les mesures dans le temps, ce qui est utile dans le suivi de l'évolution d'une maladie. Les souris maintenues en vie seront surveillées en permanence le temps que la souris se remette de l'anesthésie afin de s'assurer qu'aucune douleur ou inconfort ne soit présent.

14351 Le vieillissement est un phénomène physiologique. Depuis plus de 15 ans un phénomène de vieillissement accéléré a été décrit, sous l'effet de différents stimuli comme le stress métabolique, le stress oxydatif et le stress oncogénique. Au niveau cellulaire on parle alors de sénescence. La sénescence est un mécanisme de sauvegarde qui va permettre l'élimination de cellules ayant subi différents stress. On est alors dans un processus anti-cancéreux. Par contre lorsque cette

sénescence devient chronique elle induit massivement la sécrétion de facteurs pro-prolifératifs et on s'oriente alors vers un effet pro-tumoral. Il existe un modèle de carcinogenèse cutanée induit par un traitement chimique au cours duquel on a tout d'abord un processus de sénescence avant l'apparition des lésions de type papillomes. L'idée dans ce protocole est de voir si la surexpression d'un gène pro-sénescence au niveau cutané va alors induire un plus grand nombre de papillomes ou à l'inverse moins de papillomes. Nous disposerons alors d'un modèle qui permettra d'étudier les différents outils thérapeutiques ciblant ce gène pro-sénescence. Ce modèle présente l'avantage d'être rapide et de ne pas induire de douleurs au niveau de la souris sur l'ensemble de la durée du protocole. C'est également un modèle d'initiation tumoral, avec très rarement un foyer tumoral très agressif ou une dissémination importante de métastases.

Remplacer ce projet est basé sur de nombreuses études *in vitro*, qui nous permettent de savoir précisément les mécanismes mis en jeu. Cependant, à ce stade des recherches, l'utilisation de modèles complexes, i.e. d'animaux vivants, est requise avant d'envisager une application clinique.

Réduire le nombre d'animaux par groupe a été réduit au maximum sans toutefois compromettre l'analyse statistique des résultats. Pour cela nous utiliserons 80 souris réparties de manière égale entre mâles et femelles.

Raffiner une définition précise de points limites précoces et prédictifs ainsi qu'une surveillance adaptée des animaux permet de limiter l'apparition d'une souffrance ou d'une atteinte de l'état général de l'animal. En cas d'atteinte de ces points limites les animaux sont sortis de l'étude et mis à mort.

14352 L'autisme (ou troubles du spectre autistique – TSA) est un trouble du développement caractérisé par 3 principaux symptômes altération des interactions sociales, communication sociale diminuée et comportement restreint et stéréotypé. A l'heure actuelle, aucun traitement efficace n'est disponible. Des anomalies génétiques ou des altérations environnementales durant la grossesse ont été reliées à l'autisme. C'est pourquoi il est important de comprendre comment le cerveau se développe, et comment ce développement peut être affecté au cours des troubles autistiques.

Notre projet vise à explorer des systèmes neuronaux pendant la période périnatale puisque des altérations importantes de ces systèmes ont été décrites dans nombre de pathologies et notamment les maladies neurodéveloppementales telles que le TSA. Notre projet s'orientera autour de 3 objectifs principaux la caractérisation anatomique et fonctionnelle de systèmes neuronaux, ainsi que la validation comportementale du modèle autistique.

Ce projet a été planifié dans le respect de la règle des 3R. Les préparations *ex vivo* permettent l'étude détaillée et mécanistique des réseaux neuronaux. Il n'est en effet pas possible d'étudier des atteintes du fonctionnement du réseau neuronal sur un modèle de neurones en culture. De plus, notre projet portant sur le développement et la période périnatale, il nécessite un modèle intégré reflétant les changements physiologiques subit par le cerveau pendant ces périodes. Les souris transgéniques sont indispensables à notre étude pour être capable d'identifier les différents types de neurones. Nous analyserons nos données au fur et à mesure des expériences, permettant d'éviter les expériences inutiles et donc, de réduire le nombre des souris utilisées. En plus, dès que possible, nous appliquerons plusieurs protocoles par expérience, pour minimiser le nombre de souris utilisées. Nous avons évalué le nombre de souris permettant l'obtention de résultats statistiquement valides, c'est-à-dire obtenus sur des échantillons qui ne soient ni trop petits ni inutilement trop grands. Les souris qui subiront une procédure expérimentale se portent au nombre de 1268 dans une période de 4 ans.

Le modèle murin de TSA avec le traitement de l'acide valproïque, substance connue pour induire l'autisme chez les petits, a été auparavant décrit. Le produit sera dissout dans une solution saline et injecté dans la cavité péritonéale des femelles gestantes. Le volume injecté sera calculé pour ne pas causer de douleur par distension de la paroi abdominale. Après cette manipulation, les souris seront surveillées pour détecter le moindre signe de détresse et placées en cages individuelles équipées, en plus de l'enrichissement de base (maisons en carton spécial rongeurs qui permet aux animaux de s'abriter pour dormir, mais aussi de pratiquer certains exercices physiques comme

grimper et explorer) de matériaux spécifiques pour la nidification afin de préparer la mise-bas. Les souris seront hébergées en groupes sociaux dans des cages équipées de matériaux d'enrichissement et dans un environnement avec température, lumière et hygrométrie contrôlées avec accès ad libitum à la nourriture et à l'eau. Nous nous attacherons à surveiller le bien-être des souris avant, pendant et après les expériences. L'aspect général, le comportement et la locomotion des souris seront observés quotidiennement pour déceler d'éventuels signes de souffrance, de détresse ou de douleur. Si nécessaire, des mesures seront prises pour réduire leur stress et leur douleur. Avant toute manipulation douloureuse, une combinaison d'anesthésique et sédatif sera administrée avec une dose calculée en fonction du poids de chaque souris. Pour soulager le stress, les souris seront d'abord familiarisées avec l'expérimentateur et habitués à la salle d'expérimentation.

14353 Les cancers colorectaux représentent le troisième type de cancer le plus commun en France avec une répartition identique chez l'homme et chez la femme (selon le rapport technique de l'InVS sur la projection de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine en 2017). Le traitement de ces patients repose sur la stadification clinique de l'extension tumorale et comprend une résection chirurgicale, lorsqu'elle est possible, associée à une chimiothérapie adjuvante comprenant du 5-Fluorouracil (5-FU) dans les stades III et stade II avec facteurs de mauvais pronostic. La compréhension des mécanismes de chimiorésistance dans ces cancers est une nécessité pour améliorer la prise en charge de ces patients.

La démarche éthique et l'application du principe des 3R sera envisagée comme suit :

Remplacer La carcinogenèse du colon est un processus impliquant différents types cellulaires au sein du tube digestif. Les lignées coliques tumorales humaines ne permettent pas de reproduire ce processus *in vitro* et notamment lorsque l'interaction entre cellules cancéreuses et cellules immunitaires dans un environnement tissulaire est envisagée. L'utilisation de modèles animaux est donc indispensable dans ce type d'études.

Raffinement Une composante importante de l'environnement tissulaire est la concentration en oxygène qui est plus faible dans les tissus que l'air ambiant. Il est donc fondamental d'utiliser un modèle *in vivo* pour bénéficier d'un environnement en oxygène qui soit physiologique pour étudier le rôle des macrophages dans les mécanismes de chimiorésistance.

Dans le présent travail, nous nous proposons de profiter d'un modèle de tumeurs sous-cutanées pour comprendre comment les macrophages associés à la tumeur interagissent avec celle-ci et comment l'environnement pauvre en oxygène d'un tissu peut induire via les macrophages une résistance aux chimiothérapies. L'identification de ce mécanisme permettra de cibler ces cellules pour contrecarrer la progression de la maladie.

Le raffinement des 3R s'étend donc au-delà de ce projet avec un impact fort sur la méthodologie à venir et la transposition des résultats à l'homme.

Réduction En utilisant un modèle de cancer du côlon en sous cutané nous pourrions adresser la question du rôle des macrophages en environnement physiologique pour l'oxygène dans les mécanismes de résistance au 5-FU et ainsi réduire le nombre d'animaux utilisés dans les phases précliniques. De plus, un calcul des effectifs nécessaires basé sur une variable biologique simple (réduction de la taille tumorale) nous permettra d'atteindre une significativité des résultats avec un minimum d'animaux.

Un total de 60 souris sera nécessaire pour cette étude.

Les animaux seront hébergés en groupes avec un enrichissement du milieu. Un suivi quotidien des animaux sera réalisé. L'utilisation d'anesthésiques et/ou analgésiques sera réalisé comme décrit dans les procédures afin de prévenir et/ou réduire au minimum la douleur, la souffrance et l'angoisse dans le cas où elles surviendraient.

14354 Chaque année, environ 14 millions de cancers sont diagnostiqués à travers le monde, responsables de plus de 8 millions de décès. Les approches pour le traitement du cancer ont profondément évolué ces dernières années et l'immuno-oncologie représente aujourd'hui une approche thérapeutique

prometteuse dans ce domaine. Sa particularité n'est pas de cibler directement la tumeur comme les autres stratégies thérapeutiques mais d'aider le système immunitaire à reconnaître et détruire les cellules tumorales.

Parmi les différentes stratégies explorées en immuno-oncologie, les anticorps bi-spécifiques présentent un mode d'action intéressant. D'une part, ils lient les cellules tumorales et d'autre part, ils engagent les cellules effectrices de l'immunité, favorisant la mise en place d'une synapse cytolytique et ainsi l'élimination des cellules tumorales par les cellules immunitaires.

Le blinatumomab, un médicament aujourd'hui utilisé dans le traitement de la leucémie aiguë lymphoblastique (LAL), en est un exemple. Il s'agit d'un anticorps bi-spécifique engageant les lymphocytes T. Il se lie sélectivement au CD3 exprimé à la surface des lymphocytes T et au CD19 exprimé à la surface des cellules B malignes. Il active ainsi les lymphocytes T qui relarguent leurs enzymes protéolytiques. Toutefois, l'engagement des cellules T avec ce type de molécules montre des effets secondaires indésirables, notamment une toxicité apparente liée au relargage de certaines molécules (cytokines) propres aux cellules T.

Notre laboratoire, fort de son expertise sur les cellules NK, travaille actuellement sur le développement d'anticorps thérapeutiques équivalents, engageant non pas les lymphocytes T mais les cellules NK, cellules clés de l'immunité anti-tumorale. Les Bi-Specific NK Cell Engager (BS NKCE) se lient sélectivement à NKp46, un récepteur activateur, exprimé à la surface des cellules NK et à un antigène à la surface des cellules tumorales.

Le présent projet consiste à évaluer l'efficacité d'anticorps Bi-Specific NK Cell Engager (BS NKCE) favorisant la mobilisation des cellules NK contre les cellules tumorales exprimant B7-H3. B7-H3 est une molécule de co-stimulation appartenant à la famille des molécules B7 que l'on retrouve exprimé à la surface des cellules présentatrices d'antigène mais également à la surface de cellules tumorales. Le récepteur de B7-H3 chez l'homme est aujourd'hui encore méconnu. Toutefois, l'interaction de B7-H3 avec son récepteur entraînerait une signalisation négative au sein des cellules T, cellules de l'immunité jouant un rôle important dans la réponse anti-tumorale.

Après sélection des meilleurs BS NKCE ciblant B7-H3 dans des tests fonctionnels *in vitro*, des tests seront effectués dans des modèles animaux aussi prédictifs que possible des modèles de tumeurs liquides ou solides, xénogéniques (greffe de cellules tumorales humaines dans des souris en partie immuno-déficientes). L'intérêt des modèles xénogéniques sera de tester l'efficacité d'un candidat médicament sur des cellules tumorales humaines.

Le projet s'articulera en plusieurs étapes

-une première étape servira à évaluer les paramètres de pharmacocinétique et de pharmacodynamie des BS NKCE B7-H3 dans le sang périphérique des animaux. Le but est d'optimiser les protocoles d'administration de ces molécules pour l'évaluation de l'efficacité anti-tumorale.

-dans un second temps, un test fonctionnel *in vitro* sera réalisé, préalablement au test d'efficacité *in vivo*, afin de prédire l'efficacité des BS NKCE B7-H3 dans le modèle d'intérêt. Les molécules seront évaluées dans un test de cytotoxicité mettant en présence les cellules tumorales et les NK des souris du modèle d'intérêt.

-dans un troisième temps, l'efficacité anti-tumorale des BS NKCE B7-H3 sera évaluée sur des souris porteuses de tumeurs. Différents modèles de tumeurs seront utilisés les cellules tumorales seront greffées soit en sous-cutané (SC), soit en intraveineuse (IV).

Le nombre total d'animaux est évalué au maximum à 6300 sur 5 ans.

Dans ce contexte, afin de respecter la règle des 3R

-remplacer et réduire le nombre nécessaire de souris a été calculé afin de couvrir les différentes études qui permettront d'investiguer les effets anti-tumoraux des BS NKCE B7-H3 et de fournir des résultats statistiquement significatifs. Les données obtenues pour chaque paramètre sur des animaux traités pourront être comparées aux données obtenues sur des animaux ayant reçu un traitement placebo et/ou traitement de référence et permettre ainsi l'évaluation précise de l'efficacité de nouveaux candidats médicaments.

Le remplacement des animaux est impossible à mettre en place du fait de la nécessité d'étudier l'efficacité dans un modèle vivo complexe, impossible à mimer *in vitro*.

-Raffiner Afin de limiter le stress, les animaux sont hébergés de 2 à 5 par cage avec 2 enrichissements de milieu, au minimum.

Dans le cas d'inflammation légère au niveau du site d'injection des cellules tumorales, un nettoyage topique sera effectué.

De plus, les prélèvements sanguins seront réalisés sous anesthésie générale (gazeuse à l'isoflurane) et les volumes ainsi que les fréquences de prélèvement suivront les recommandations du CEEA.

Les points limites relatifs à la perte de poids, à l'apparence et au comportement des animaux (prostration, poils piqués, isolement, difficultés respiratoires (dyspnée), paralysie, etc.), à l'aspect et aux volumes des tumeurs (nécrose, volume supérieur ou égal à 1800mm³), sont des critères qui justifieront le sacrifice des animaux.

14355 Le système nerveux périphérique (SNP) est la partie du système nerveux formée des ganglions et des nerfs à l'extérieur du cerveau et de la moelle épinière. Sa fonction principale est de faire circuler l'information entre les organes et le système nerveux central (SNC). Il comprend le système nerveux somatique (SNS) et le système nerveux autonome (SNA). Le SNA régule les fonctions des organes internes, comme le pancréas, le cœur ou encore la rate.

Notre objectif est de mieux comprendre les effets des molécules inflammatoires sur l'activité des nerfs périphériques afin d'utiliser l'enregistrement de l'activité spontanée de ces nerfs pour un diagnostic plus précoce des maladies inflammatoires.

Pour cela nous utiliserons des méthodes d'induction de la réponse inflammatoire bien caractérisées que sont l'injection de molécules inflammatoires associées à des agents pathogènes par différentes voies (intraveineuse, sous-cutanée ou intrapéritonéale).

Notre démarche expérimentale consistera à enregistrer l'activité de nerfs périphériques du SNA chez des animaux anesthésiés avant (ligne de base) et après injection des molécules inflammatoires.

Les expériences proposées ont été pensées afin de répondre à la réglementation éthique en vigueur qui impose aux chercheurs de trouver des méthodes de remplacement, de réduire le nombre d'animaux utilisés et de raffiner les protocoles expérimentaux.

Remplacement Ce type d'étude ne peut être envisagé que sur des organismes entiers préservant l'intégrité des interactions entre le système immunitaire et nerveux dans un contexte pathologique et non pathologique.

Réduction Le plan d'étude est conçu pour éviter toute répétition non nécessaire des procédures en réalisant des tests statistiques aussi précocement que possible dans le déroulé des procédures. Par conséquent, le nombre de souris indiqué est un nombre maximum. D'autre part, en tenant compte des exigences de réduction, également imposée par la législation, nous avons choisi d'utiliser un nombre minimum de souris par groupe expérimental qui nous permet d'obtenir des résultats statistiquement exploitables. En utilisant des doses utilisées dans d'autres études, nous éviterons de réaliser une étude dose-réponse et nous réduirons ainsi d'autant le nombre d'animaux utilisés dans cette étude.

Raffinement Des mesures de raffinements seront mises en place afin de limiter au maximum les contraintes imposées aux animaux dans le contexte de cette étude les animaux recevront un analgésique pré-opératoire et les interventions chirurgicales seront menées suivant un protocole d'anesthésie et d'analgésie en prenant soin de maintenir la température corporelle des animaux en les plaçant sur une couverture chauffante. Enfin à leur arrivée, les souris de 7 semaines seront hébergées dans un environnement enrichi (nid, ouate).

1008 souris seront utilisées pour ce projet.

14356 L'objectif de ce projet est de mettre au point la technique d'injection intra-vitréenne et de prélèvement d'humeur vitrée chez le miniporc afin de pouvoir réaliser des études de toxicologie réglementaire en administrant le médicament par cette voie. En effet, certaines maladies oculaires comme la dégénérescence maculaire liée à l'âge nécessitent l'administration par voie intra-vitréenne de médicaments et il est nécessaire de réaliser des études précliniques réglementaires par la même voie d'administration lors du développement de ces médicaments.

Le projet utilise un maximum de 11 miniporcs (5 miniporcs maximum pour l'étude de faisabilité et 6 miniporcs maximum pour l'étude pilote). Dans la mesure du possible, des miniporcs ayant déjà été inclus dans un projet antérieur seront utilisés. Le nombre d'animaux utilisé est adapté à la nécessité de valider la nouvelle technique sur un effectif suffisant avant de démarrer des études réglementaires tout en réduisant le nombre au strict minimum, en application du principe des 3R. Les procédures d'injection intra-vitréenne et de prélèvement de vitré seront réalisées sous anesthésie générale et analgésie locale. Chez l'homme, ces procédures sont réalisées de manière ambulatoire sans analgésique par voie générale cependant après chaque injection, une pommade lubrifiante sera appliquée sur les yeux des animaux afin de limiter les sensations d'inconfort éventuelles. Les animaux feront l'objet d'une surveillance quotidienne sous le contrôle d'un vétérinaire leur poids, la consommation de nourriture seront suivis et des examens ophtalmologiques seront réalisés a minima de manière hebdomadaire pour détecter de manière précoce toute douleur ou toute complication. En cas de signes cliniques généraux ou oculaires, pertes de poids ou signes de douleur, des mesures appropriées seront prises pour éviter la souffrance des animaux. Les miniporcs seront hébergés en groupe (femelles) dans des boxes équipés de planchette de repos, d'un panier et sur tapis de litière leur permettant de fourrager. Un programme d'enrichissement est mis en place avec mise à disposition d'une chaînette métallique dans le box et distribution chaque jour d'enrichissement alimentaire (par exemple graines de tournesol, cranberries, légume frais, ...). Une récompense sera distribuée à chaque animal après chaque acte pouvant induire du stress.

14357 La prise de décision et l'exécution de l'action sont sollicitées en permanence dans notre vie quotidienne. Malgré des décennies de recherche, la compréhension des mécanismes neuronaux régissant ces fonctions reste incomplète et controversée. Des études récentes indiquent néanmoins qu'un ensemble de noyaux situés sous le cortex cérébral, les ganglions de la base (BG), joueraient un rôle crucial dans la régulation commune des prises de décision et de l'exécution des mouvements en fournissant un signal appelé « urgence ». En accord avec ces hypothèses, un dysfonctionnement des ganglions de la base est associé à de nombreux déficits caractérisés par une inaptitude à sélectionner des durées de décisions et de mouvements adaptées à la situation rencontrée, telle qu'observée chez les sujets impulsifs ou chez les patients parkinsoniens. Ce projet de recherche fondamentale a pour but de mieux comprendre le fonctionnement neurophysiologique des ganglions de la base chez le primate non humain pendant la prise de décision entre actions.

Pour étudier et décrire le rôle des BG dans un comportement interactif et complexe, le primate non humain est le modèle privilégié car il possède des capacités cognitives et motrices suffisamment proches de celles de l'homme pour tester la prise de décision entre actions et il permet l'utilisation de techniques de mesures possédant les résolutions à la fois temporel et spatiale nécessaire à ce type de problématique (non réalisable chez l'homme à l'aide de la neuroimagerie). Notamment, des enregistrements électrophysiologiques dans les BG et dans plusieurs structures susceptibles d'influencer leurs activités seront réalisés chez quatre singes macaques rhésus afin de (1) tester de manière univoque l'hypothèse selon laquelle un signal global stimule à la fois l'urgence des décisions et la vigueur de l'action choisie, (2) comprendre l'origine et la formation du signal d'urgence et (3) décrire les principes de ce mécanisme de régulation.

Les quatre animaux suivront l'ensemble des procédures permettant de mener à bien ce projet (sévérités légères à modérées) Entraînement à la tâche comportementale sous contrôle alimentaire (6-8 mois) Repérage des structures cibles par IRM anatomique Implantations et désimplantation des différents éléments permettant la réalisation des enregistrements électrophysiologiques Enregistrements électrophysiologiques sous contrôle hydrique (10-12 mois). L'ensemble des

procédures devraient s'étendre sur environ 24 mois pour chaque animal. Deux singes pourront participer aux différentes procédures simultanément, afin que la durée totale du projet n'excède pas 5 ans. Les différentes procédures se feront sous contrôle rapproché de l'animal permettant de mettre fin au protocole si une gêne est constatée. À la fin des procédures, les animaux ne seront pas mis à mort. Les implants chirurgicaux seront retirés sans séquelles pour les animaux et ils pourront de ce fait soit participer à un autre projet, soit être placés dans un lieu de vie approprié pour leur retraite.

Application des 3Rs

Réduction - Ce projet a été planifié afin de maximiser la quantité de données que l'on peut obtenir avec chaque animal et donc minimiser le nombre d'animaux nécessaires à cette étude. Plusieurs types de données seront collectées sur chaque animal comportementales, psychophysiques, électrophysiologie musculaire et neuronale. De plus, la technique d'enregistrement neurophysiologique employée pour ce projet permettra de collecter de nombreuses données en un minimum de temps, réduisant ainsi le risque de recours à des animaux supplémentaires pour garantir la puissance statistique des résultats.

Remplacement - Il est de nos jours impossible de recueillir les données nécessaires à la réalisation de ce projet à partir d'expériences qui n'impliqueraient pas les animaux, et les primates non humains en particulier. En comparaisons à d'autres espèces animales, les expériences menées chez le singe macaque présentent plus de pertinence pour la compréhension des fonctionnements et disfonctionnement de la cognition et de l'action humaine en raison des capacités cognitives et motrices de cet animal très proches de celles de l'homme, et des similarités structurelles du cerveau entre les deux espèces. Il est donc impossible de répondre à la question du remplacement dans ce projet.

Raffinement - L'animalerie dans laquelle les animaux seront hébergés est spécialement étudiée pour favoriser le bien-être animal. L'animalerie dispose de lumière naturelle, de distractions grâce aux vues sur l'activité humaine, de contacts sociaux, d'activités quotidiennes et un espace plus vaste dans lequel les animaux peuvent non seulement bouger mais aussi s'échapper comme ils le feraient dans la nature en cas de tension entre eux. Le contrôle de la motivation des animaux est choisi afin d'avoir le moins d'impact possible sur leur bien-être. On aura en effet recours au contrôle hydrique, considéré comme étant le contrôle le plus impactant, que lorsque l'animal sera en phase d'enregistrements électrophysiologiques. Toutes les phases précédentes se feront sous contrôle alimentaire. Dans tous les cas, les singes seront incités à coopérer et participer aux manipulations par le biais du renforcement positif. Les enregistrements électrophysiologiques sont conçus pour supprimer les gênes quotidiennes associées à ce type de procédure et les implants chirurgicaux seront fabriqués « sur mesure » pour diminuer les risques de complications post-chirurgicales. La pose de ces implants sera faite sous anesthésie générale et contrôle antidouleur permanent, en condition aseptique stricte. La chaise dans laquelle les singes effectueront la tâche est large et de type « ouverte », conçue pour que la contention soit minimale. Le matériel permettant de mesurer et enregistrer le mouvement des yeux et la taille de la pupille est basé sur l'analyse d'images vidéo et ne constitue donc aucune gêne pour l'animal. Enfin, les implants chirurgicaux seront retirés à la fin des procédures et les animaux pourront participer à un autre projet ou gagner un lieu de vie approprié pour leur retraite.

14358 Les myopathies congénitales sont des maladies génétiques rares caractérisées par des faiblesses musculaires généralisées telles qu'un déficit respiratoire, une atrophie musculaire et la difficulté de mouvoir les bras et/ou de marcher. Les myopathies centronucléaires (CNM), un sous-groupe de myopathies congénitales, font parties des formes les plus graves touchant 1/50000 naissances dans le monde entraînant une perte de la marche autonome et parfois une incapacité respiratoire associée au décès précoce des patients lors de l'enfance. L'histopathologie révèle la présence de noyaux centraux ainsi que le mauvais positionnement de certaines organelles, telles que les mitochondries. Les mutations les plus prévalentes dans les CNM ont été trouvées dans les gènes MTM1, DNM2 et BIN1. L'absence de thérapie spécifique et l'augmentation du nombre de mutations et de gènes impliqués dans cette maladie mènent au besoin d'identification d'un mécanisme

pathologique commun pour développer des cibles thérapeutiques efficaces pour plus d'une seule pathologie.

De ce fait, de récentes avancées suggèrent que l'altération de la distribution mitochondriale serait une marque pathologique commune à toutes les CNM. De plus, de récentes études suggèrent un rôle de la DNM2 dans la fonction mitochondriale. Nous souhaitons donc planifier un projet visant à mieux comprendre les défauts mitochondriaux et permettant de développer une nouvelle cible thérapeutique pour cette maladie. Pour ces travaux il est nécessaire d'utiliser la souris, indispensable pour étudier d'une part la physiopathologie et d'autre part l'amélioration des symptômes. Par cette étude nous envisageons d'évaluer les conséquences fonctionnelles et thérapeutiques de la modulation de la fonction mitochondriale sur la maladie, dans des modèles de souris myopathes dont les mutations génétiques reproduisent fidèlement les symptômes musculaires de patients atteints de CNM. De ce fait nous souhaitons réduire la fission mitochondriale (à l'aide d'une souris DRP1KO) dans 2 modèles de souris CNM (S619L et MTM1K0) pour voir si cette modulation a des effets positifs sur la maladie.

Des études cellulaires sont prévues afin de réduire au maximum le nombre d'animaux. En revanche, seul le modèle animal permet d'étudier d'une part la physiopathologie et d'autre part l'amélioration des symptômes (REMPACEMENT).

Le nombre d'animaux sera réduit au maximum pour obtenir une puissance statistique suffisante pour déterminer si le traitement est efficace.

15 animaux maximum par groupe seront nécessaires et ce pour 8 groupes différents, soit un maximum de 120 animaux (tout animal économisé étant un gain de réduction supplémentaire).

24 animaux seront nécessaires pour générer ces animaux expérimentaux.

Au total, 144 souris seront utilisées au maximum pour ce projet.

Afin de préserver le bien-être des animaux, les souris seront surveillées quotidiennement. Tout signe de douleur ou inconfort sera pris en charge en prenant les mesures appropriées en fonction du niveau de douleur ou inconfort observé (soit modification dans l'alimentation pour une nourriture en gel, soit un analgésique sera administré, soit les animaux seront euthanasiés prématurément si nécessaire) (RAFFINEMENT).

14359 Nous analyserons les effets anti-amnésiants d'une nouvelle série de molécules en développement agissant comme agonistes du récepteur sigma-1 dans un modèle murin de syndrome schizophrénique et de maladie d'Alzheimer. La pathologie sera induite par injection répétée pendant 10 jours de phencyclidine, un anesthésique dissociatif. Les capacités cognitives des animaux seront analysées par des tests de comportement classiques (alternance spontanée, évitement passif, reconnaissance d'objet, apprentissage en piscine). Le donepezil et l'ANAVEX2-73 seront utilisés comme molécules de référence. Les animaux (2160 souris pour l'ensemble de l'étude) seront ensuite sacrifiés. Ce projet de maturation vise à sélectionner un composé efficace dans les troubles cognitifs liés à la schizophrénie et la maladie d'Alzheimer. Le nombre d'animaux par groupe est limité à ce qui doit permettre d'obtenir des analyses statistiques fiables (12 en analyses comportementales) et seuls les composés présentant une activité pharmacologique *in vitro* (très bonne affinité pour les récepteurs sigma-1 et très bonne sélectivité vis-à-vis des récepteurs sigma-2) et une absence d'effets secondaires rédhitoires seront testés. L'utilisation du modèle animal reste cependant nécessaire vu la finalité de l'étude concernant les troubles cognitifs liés à la schizophrénie.

14360 Les changements climatiques et environnementaux influencent la dynamique et la structure des écosystèmes marins, affectant la distribution et l'abondance des espèces marines. Les éléphants de mer austraux (*Mirounga leonina*) peuvent être particulièrement affectés par cette variabilité spatiale et temporelle, ceux-ci présentant des périodes de recherche alimentaire en mer avec des périodes de jeûne à terre. Différentes stratégies de recherche alimentaire peuvent influencer l'efficacité de recherche alimentaire et de plongée, celle-ci étant la clé de leur succès de reproduction et de mue à terre. Ce projet vise à étudier les contraintes énergétiques d'un prédateur

marin au cours de son cycle de vie en lien avec son environnement et à étendre le jeu de données environnementales avec le programme SNO-MEMO (Service National d'Observation Mammifères Echantillonneurs du Milieu Océanique). Ce projet permettra de mieux comprendre comment les stress environnementaux tels que le réchauffement des océans peut influencer la dépense énergétique, l'énergie ingérée et ainsi la balance énergétique de ce prédateur marin plongeant à d'importantes profondeurs, et comment les traits de personnalité individuels influence les stratégies énergétiques individuelles.

Ces travaux s'appuient sur la pose d'appareils enregistreurs (balises Argos, GPS, accéléromètres, enregistreur cardiaques, acoustiques...). Ils permettent aussi la collecte de données océanographiques (température, salinité...) au cours des trajets en mer de ces animaux. Ces informations contribuent à identifier les habitats critiques et ainsi à la conservation de cette espèce.

Ce projet regroupe 6 procédures qui seront mises en place lors de 3 années successives, les animaux étant capturés, équipés de balises collées sur leur poil (au niveau de la tête ou du haut du dos) après anesthésie, puis relâchés après 15 à 45 minutes de manipulations sur le terrain. Les appareils sont récupérés après 15 à 20 jours (étude de la mue), 2 à 3 mois (étude du voyage en mer post-reproduction) ou 7 à 8 mois (étude du voyage en mer post-mue) pour étudier l'ensemble du cycle de vie. Ces équipements concerneront 40 femelles et 35 mâles par an, soit 120 femelles et 105 mâles pour 3 ans. 33 femelles pour les 3 ans seront, en plus des balises externes, équipées d'un appareil enregistrant la fréquence cardiaque, permettant de mesurer leur métabolisme. 120 juvéniles (360 pour 3 ans) seront bagués puis pesés à leur sevrage, permettant d'estimer le succès reproducteur des individus. 3 femelles (9 sur 3 ans) seront capturées et équipées d'appareils permettant d'étudier l'hypoxie cérébrale au cours de la plongée (par capteur externe infra-rouge posé sur la tête estimant l'oxygénation cérébrale).

L'objectif étant d'étudier les éléphants de mer dans leur milieu naturel, ils ne peuvent être remplacés par une autre espèce, par des animaux d'élevage, ou encore par des expérimentations en captivité. La « règle des 3R » est toutefois appliquée, puisque le nombre d'animaux capturés est limité pour répondre aux objectifs, et que l'équipe sur le terrain met en place toutes les mesures nécessaires à la réduction du dérangement, de l'angoisse, du stress, ainsi que de l'éventuelle douleur des animaux. Les balises océanographiques externes communément déployées sur les éléphants de mer n'impactent ni leur survie, ni leur succès de pêche, et nous estimons manipuler chaque année moins de 0,005 % de l'effectif total (hors jeunes de l'année) de la population d'éléphants de mer Kerguelen, et 0,018 % des femelles adultes.

14361 Le traitement du cancer demeure un défi et il est urgent de trouver de nouvelles solutions de traitement pour améliorer l'espérance de vie des patients qui en sont atteints. L'objectif principal de ce projet est d'améliorer l'efficacité de certaines drogues anticancéreuses (chimiothérapies) couramment utilisées pour traiter les cancers du côlon et du sein. Dans ce but, le type de recherche abordé pour ce projet vise à combiner certaines chimiothérapies avec un autre médicament (glyceryl trinitrate ou GTN, aussi appelé nitronal). Des travaux réalisés *in vitro* ont démontré l'intérêt de l'association chimiothérapie/nitronal pour mieux tuer les cellules cancéreuses et freiner leur déplacement ou migration (à l'origine de la formation de nouvelles tumeurs ou métastases). D'après la littérature, la capacité du nitronal à éliminer les cellules cancéreuses est associée à la présence de petites protéines appelées cytokines pro-inflammatoires (produites par les cellules cancéreuses et principalement par les cellules non cancéreuses composant la tumeur, comme les cellules immunitaires). Il est connu que la production de ces cytokines augmente avec les traitements de certaines chimiothérapies. L'enjeu serait de proposer une thérapie combinatoire efficace à base de nitronal si des cytokines pro-inflammatoires particulières sont produites au sein des tumeurs sous l'effet des chimiothérapies.

L'objectif de cette étude expérimentale est de tester la combinaison chimiothérapies/nitronal sur le développement d'une tumeur (croissance et migration des cellules cancéreuses) chez la souris. L'utilisation du modèle animal souris est majeur en cancérologie car il permet de reproduire les caractéristiques de la pathologie cancéreuse humaine (hétérogénéité cellulaire, capacité des cellules cancéreuses à migrer et à former des métastases). Notre étude consistera à injecter par

voie sous-cutanée dans le flanc de la souris anesthésiée des cellules cancéreuses pour permettre le développement d'une tumeur dans le but de tester l'efficacité des différents traitements (par injection) sur son développement (croissance et migration des cellules cancéreuses). Des outils ont été développés chez cet animal pour répondre précisément à ces questions (mesure du volume des tumeurs, prélèvement de sang à la joue, prélèvement des poumons en fin d'expérience après sacrifice). Les dommages de ces expériences seront limités par une surveillance étroite très régulière des animaux pour détecter une souffrance.

Ce projet a été élaboré dans le respect de la règle des 3R (remplacer, réduire, raffiner) tout en considérant un nombre d'animaux suffisant pour permettre une analyse statistique adéquate des résultats.

Remplacer les modèles de culture cellulaire *in vitro* ne peuvent pas se substituer totalement aux expérimentations *in vivo* étant donné que nous cherchons à étudier l'impact des traitements (d'une part sur le taux de cytokines issues de l'hétérogénéité cellulaire des tumeurs et d'autre part sur la migration des cellules cancéreuses et la formation des métastases ce qui nécessite pour ces deux points un organisme vivant entier.

Réduire ce projet nécessitera 504 souris sur une période de 5 ans.

La maîtrise du modèle animal chez la souris au laboratoire permet de réduire le nombre d'animaux utilisés au minimum nécessaire pour les expérimentations envisagées afin d'obtenir des résultats statistiquement fiables. En fonction des résultats qui seront obtenus avec le modèle d'étude de cancer colique, le protocole de chimiothérapie standard (c'est-à-dire le traitement FOX (5-fluorouracile/oxaliplatine) ou bien FIRI (5-fluorouracile/irinotecan) présentant le meilleur effet anti-tumoral en combinaison avec le nitronal (frein au développement tumoral) pourra être conservé pour réduire le nombre d'animaux utilisés.

Raffiner les animaux seront observés très régulièrement (tous les 2 à 3 jours) de façon à vérifier leur bien-être (absence de perte de poids, d'appétit, de déshydratation ou d'immobilité). Les animaux seront hébergés en petits groupes pour limiter l'angoisse/le stress. De plus un enrichissement sera ajouté (matériel de nidification, petit récipient en verre) visant à améliorer la zone de confort.

Les manipulations (injections prélèvements) pouvant générer un inconfort pour l'animal seront réalisées sous anesthésie générale.

Tout au long de l'étude, un animal sera anesthésié puis euthanasié si les points limites déterminés concernant la taille et l'aspect des tumeurs, la perte de poids, l'apparition de modification du comportement et de signes de souffrance sont atteints.

14362 Le système urinaire produit, stocke et élimine l'urine. Chez l'homme, il comprend deux reins, deux uretères, la vessie et l'urètre. Dans plusieurs états pathologiques, des calculs peuvent se former dans les voies urinaires. Généralement, les calculs sont éliminés spontanément par le système urinaire sans dommage pour le patient. Mais si leur taille est trop importante par rapport à l'anatomie des voies urinaires, les calculs peuvent rester dans la vessie ou les reins ou rester coincés dans l'urètre. Les calculs dans les voies urinaires peuvent entraîner une rétention d'urine, associée à une dilatation des cavités rénales, à une douleur intense (coliques néphrétiques) et à une possible insuffisance rénale.

Pour retirer les calculs il faut utiliser un dispositif spécifique consistant en un extracteur en forme de panier introduit par les voies naturelles.

Le dispositif étudié est un nouvel extracteur de calculs qui présente de nombreux avantages théoriques par rapport à ceux existant sur le marché, regroupant les fonctionnalités de plusieurs modèles en un seul instrument. Cela permettrait de simplifier les procédures pour le patient.

Le but de cette étude est d'évaluer *in vivo* dans un modèle porcin, ce nouvel extracteur de calculs permettant de saisir successivement plusieurs calculs dans les voies urinaires.

Le modèle porcin a été choisi en raison de sa grande taille et de sa proximité anatomique avec l'homme.

La règle des 3 R est largement prise en compte puisque :

- Le modèle animal a été réservé à la validation définitive de l'efficacité et de la sécurité du dispositif, de nombreux tests ayant été réalisés sur banc d'essai. Seul le modèle animal vivant permet d'étudier le retentissement sur les voies urinaires qui sont fragiles et difficiles d'abord (exigence ANSM et FDA).

- Il s'agit de procédures chirurgicales standard pour lesquelles une anesthésie et une analgésie peropératoire adaptées sont utilisées. La souffrance animale est donc réduite au maximum. Les animaux sont stabulés au maximum

3 jours en amont de ces procédures, dans un milieu enrichi comme exigé par la réglementation animale (balle, cordes, jouets spécifiques non dangereux notamment du risque d'inhalation et/ou d'ingestion).

- Seuls deux animaux seront opérés ce qui est le nombre minimum pour tester le dispositif et dépister d'éventuels dysfonctionnements

14363 Le botulisme animal, notamment le botulisme aviaire est une maladie due à l'action de la toxine botulique produite par une bactérie, *Clostridium botulinum*. Cette pathologie, ré-émergente au niveau mondial depuis une dizaine d'années, est encore méconnue et de ce fait délicate à contrôler. Disposer d'un modèle infectieux de botulisme aviaire permettrait d'une part, d'améliorer les connaissances sur la dynamique d'infection du botulisme mais également, de disposer d'un outil efficace pour évaluer les moyens de lutte pour prévenir, contrôler ou traiter la maladie.

Peu de données sont disponibles dans la littérature concernant la reproduction expérimentale du botulisme aviaire (4 études dont 3 publiées dans les années 70). Sur la base de ces études, une équipe a récemment essayé, sans succès, de reproduire la maladie en conditions expérimentales. Le botulisme aviaire est dû à la production in situ de la toxine botulique par le pathogène puis à la ré-ingestion de la toxine par l'animal via coprophagie. L'identification des conditions optimales d'implantation de *C. botulinum* au niveau de l'appareil digestif des animaux est donc un prérequis au développement d'un modèle de botulisme aviaire. L'objectif étant dans un premier temps d'obtenir la colonisation des animaux par la bactérie - et non d'obtenir des symptômes de botulisme - il est possible d'utiliser des souches de *C. botulinum* non toxiques; afin de ne pas induire de signes cliniques chez les individus.

Un premier essai a été réalisé en 2018 et a montré que la co-infection d'une souche non-toxique de *C. botulinum* avec une souche de coccidie permettait d'obtenir une colonisation chez 9 poulets sur 10 avec une inoculation par voie orale. Un second essai mené en 2019 n'a cependant pas permis de reproduire ces premiers résultats démontrant la nécessité d'identifier et d'optimiser les paramètres du modèle pour que celui-ci soit robuste et reproductible.

Le projet a pour objectif d'identifier les modalités expérimentales permettant d'obtenir l'implantation de *C. botulinum* chez le poulet de manière reproductible.

Pour mener à bien ce projet, 3 étapes sont envisagées

- Une première étape de mise au point pour obtenir la colonisation caecale par *C. botulinum*
- Une seconde étape d'optimisation en sélectionnant la modalité la plus concluante dans la partie mise au point
- Une dernière étape de validation et de confirmation de reproductibilité du modèle

Pour la mise au point du modèle, 252 poulets seront répartis dans 3 essais de 8 lots de 10 sujets, chaque lot étant soumis à des conditions différentes (mode de préparation de l'inoculum, dose inoculée, présence ou non de coccidies, traitement antibiotique préalable, nombre d'inoculations, modalités d'élevage avant inoculation...). Quatre animaux par essai serviront à évaluer l'implantation des coccidies.

Pour l'étape d'optimisation, 120 poulets seront utilisés dans 6 lots de 20 sujets. Enfin, pour l'étape de validation, 40 sujets seront utilisés dans deux lots de 20 sujets.

Au total, 412 animaux seront utilisés pour les trois étapes du projet. Cependant, le nombre d'animaux utilisés sera réduit au niveau minimal. Les essais de mise au point du modèle

expérimental ont été conçus pour utiliser un nombre d'animaux limité mais suffisant pour s'affranchir des variations inter-individuelles et obtenir des résultats permettant de calculer des pourcentages de réussite. Le suivi de l'implantation de *C. botulinum* se fera via des écouvillons cloacaux (méthode non invasive), l'analyse des fientes, de prélèvements d'environnement et, après mise à mort des animaux, via l'analyse des caeca en fin d'expérimentation.

L'utilisation d'un modèle animal pour ce projet est nécessaire et ne peut être remplacée par des expériences *in vitro* car il n'est pas possible de déterminer les conditions optimales d'implantation de *C. botulinum* chez le poulet en conditions *in vitro*. Il n'existe actuellement pas de modèle permettant de s'affranchir des animaux cibles de cette affection.

Les raffinements et les enrichissements suivants ont été prévus pour les essais élevage en groupes homogènes, papier cartonné ondulé sur tout ou partie du plancher des cages pour soulager les aplombs, cordelettes suspendues, éclairage naturel complété par un éclairage artificiel en jours courts. Des points limites ont été définis mais aucun signe clinique n'est attendu dans ces essais.

14364 La daurade royale (*Sparus aurata*), le loup (*Dicentrarchus Labrax*), le muge (*Mugil cephalus*) et la Saupe (*Sarpa salpa*) sont des espèces côtières de premier plan en Méditerranée française, tant pour l'importance de leur exploitation, leur valeur commerciale et leur aquaculture, que pour leurs aspects emblématiques dans la région. Aujourd'hui concernés par les plans de gestion des petits métiers en Méditerranée, de nombreux aspects de leur cycle de vie restent pourtant inconnus, limitant la capacité des scientifiques à fournir un appui aux gestionnaires pour la gestion de ces ressources. Les lagunes méditerranéennes sont particulièrement importantes dans le cycle de vie de ces espèces migratrices mais leur dynamique spatiale en relation avec les caractéristiques de l'habitat sont dans leur début pour la Daurade et Loup, et restent inconnue pour les deux autres espèces.

Dans la suite d'autres projets locaux sur la daurade et le loup, ce projet vise à étendre l'emprise spatiale du suivi des daurades royales sauvages (N=200) et des loups (*Dicentrarchus Labrax*, N=100). Pour les deux autres espèces (Muge et Saupe), seule une approche à fine échelle (à l'échelle d'un étang) sera mise en place, avec le marquage de 50 muges et 50 saupes afin d'observer pour la première fois le comportement spatial de ces deux espèces à l'échelle d'une lagune.

Suite au marquage, les animaux seront remis dans le milieu naturel et suivis pendant plus de 500 jours sur le terrain grâce à des stations d'écoutes réparties stratégiquement au sein des différentes lagunes de Méditerranée pour la daurade et le loup, et dans le Prévost pour la Saupe et le Muge.

Afin d'optimiser le protocole, nous avons suivi la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner)

- Remplacer il est impossible dans le cadre de ce protocole ciblant ces 4 espèces de les remplacer, l'intérêt du projet étant justement d'étudier le comportement spatial de ces espèces dans leur milieu naturel.

- Réduire le nombre d'individus testés dans les différents lots et procédures est minimal compte tenu de la nécessité d'avoir des significativités statistiques. En effet, la Méditerranée abrite plusieurs tonnes de daurades et loups chaque année durant la période estivale qui exploitent différents habitats de ces lagunes comme sites d'alimentation. N=200 pour la daurade et N=100 pour le loup a été estimé de manière arbitraire comme le nombre d'individus suivis permettant de capturer la majorité des comportements spatiaux possibles pour cette espèce à l'échelle du site d'étude sur un cycle de 500 jours. Les 50 individus marqués pour le muge et la Saupe correspondent au chiffre minimum arbitraire pour capturer la majorité des comportements spatiaux de ces espèces à l'échelle d'une lagune. Il est entre autre basé sur le nombre validé de marquage spécifiques pour la Daurade pour étudier son comportement à l'échelle de l'étang.

- Raffiner : Tout a été mis en place dans le cadre des procédures pour limiter la souffrance et le stress des animaux par des procédures d'anesthésie optimales durant les phases pré opératoire, opératoire et post opératoire. Leur capture (la technique de pêche professionnelle « la capéchade », et à la ligne à hameçon par les scientifiques) sont des techniques de capture peu traumatisante

pour ces espèces, et surtout les seules disponibles pour capturer les individus sauvages tout en préservant leur bien-être.

14365 Contexte scientifique

Les maladies cardiovasculaires représentent la première cause de décès dans le monde. Malgré les progrès récents et la mise en place de stratégies thérapeutiques visant à diminuer le mauvais cholestérol dans le sang, plus de 17 millions de patients décèdent de pathologies cardiovasculaires chaque année. Récemment, l'inflammation est apparue comme une composante centrale contribuant au développement des maladies cardio-métaboliques mais les mécanismes qui régissent cette inflammation restent inconnus. Le dérèglement des cellules immunitaires est souvent associé à la progression des maladies cardio-métaboliques. Plus précisément, au sein de la plaque d'athérome (plaque de gras bouchant les artères, essentiellement composée de cholestérol et de cellules immunitaires), les macrophages vont jouer un rôle important dans l'élimination des débris et des cellules apoptotiques. De récents résultats préliminaires ont pu montrer l'importance du déplacement des mitochondries dans la réponse inflammatoire. Le déplacement des mitochondries au sein des cellules est rendu possible par une protéine nommée Rhot1 (Mitochondrial Rho GTPase 1). La protéine Rhot1 facilite le transport mitochondrial en permettant l'attachement des mitochondries aux microtubules. Le rôle mitochondrial des macrophages est lié à leur fonction inflammatoire connue pour avoir un rôle central dans l'inflammation à bas bruit des complications cardio-métaboliques (i.e, obésité, diabète, athérosclérose). Ce projet vise à identifier le rôle de la protéine Rhot1 sur la fonction des macrophages et les conséquences de sa mutation sur l'inflammation et les maladies cardio-métaboliques.

Hypothèse de travail

Notre projet vise à enlever de manière sélective Rhot1 au sein des cellules myéloïdes. Nous nous intéressons ainsi à la contribution de la protéine Rhot1 sur le nombre et la fonction des cellules myéloïdes (macrophages, monocytes) et son impact dans les maladies cardio-métaboliques.

Justification du modèle

En condition physiologique les souris sont naturellement protégées contre l'athérosclérose. Afin d'étudier cette pathologie nous devons donc induire la mutation ApoE dans nos souris d'intérêts. Nous avons choisi ce modèle de souris car c'est un modèle standard, bien reconnu dans le domaine scientifique pour l'investigation de manipulations génétiques liées aux maladies cardiaques. Toutefois, toutes les procédures menées avec ce modèle seront interrompues avant l'apparition de signes cliniques douloureux pour les animaux. Ce projet fait aussi appel à des lignées de souris génétiquement modifiées qui ne présentent pas de phénotype dommageable (Rhot1 fl/fl, Lyz2^{Cre} et Cx3Cr1^{Cre}). De plus, des mesures de réduction et de raffinement sont prévues afin de limiter la sévérité des procédures.

Les 3R :

Remplacement Les maladies cardio-métaboliques sont des pathologies complexes dans lesquelles de multiples voies métaboliques et physiologiques interviennent. De ce fait, une approche *in vivo* reproduisant ces interactions nous est indispensable pour répondre à notre problématique. De plus, l'étude du dépôt de cholestérol dans les artères ne peut être réalisé *in vitro*. Des modèles murins capable de développer de l'athérosclérose ont donc été développés et validés par la communauté scientifique comme outils d'études précliniques.

Réduction Notre approche statistique garantit l'obtention de résultats exploitables avec le plus petit nombre d'animaux possible. Dans le cadre de cette étude, et pour chaque groupe, nous utiliserons des souris mâles et femelles. Ceci permettra d'utiliser l'ensemble des animaux générés dans les élevages. Les résultats pourront donc être appliqués à la fois aux hommes et aux femmes. Ce projet prévoit l'utilisation de 440 souris sur 5 ans.

Raffinement La mise en place de points limites précoces, prédictifs et adaptés à chaque procédure, basés sur une observation détaillée des animaux au cours de chaque procédure permettront de limiter la sévérité de celles-ci. Les souris seront de plus hébergées en groupe (6 souris par cage,

ou 5 souris par cage si une des souris fait 30g ou plus) dans des cages enrichies (igloos, ouate, baguettes de bois à ronger).

Perspectives

Cette étude pourrait ouvrir de nouvelles perspectives de traitement visant à mieux contrôler la fonction des cellules immunes et ceci dans les maladies cardio-métaboliques. L'ensemble des procédures proposées dans ce projet sont connues comme non remplaçables, par des procédures ne faisant pas intervenir directement l'animal.

14366 Le cerveau est composé de nombreux types de neurones communiquant entre eux via des contacts spécifiques appelés synapses. Chaque neurone peut être contacté par plusieurs types de neurones formant des synapses aux caractéristiques morphologiques et fonctionnelles distinctes. Notre projet est de comprendre ce qui sous-tend cette diversité synaptique au niveau moléculaire. Ceci est essentiel pour comprendre le développement du cerveau et son fonctionnement, mais aussi pour comprendre l'origine des maladies neuro-développementales comme l'autisme ou la schizophrénie, aujourd'hui considérées comme des maladies des synapses.

Notre hypothèse est que chaque type de synapse d'un même neurone cible possède une identité moléculaire spécifique qui lui permet de se connecter à un endroit précis sur sa cible et pas ailleurs. Notre système d'étude est le réseau formé entre deux régions du cerveau, l'olive inférieure et le cervelet (réseau olivo-cérébelleux), dans lequel la cellule de Purkinje forme différents types de synapses avec différents neurones ayant chacun un territoire propre. Notre modèle d'étude est la souris qui est devenue un modèle de choix pour l'étude des mécanismes moléculaires régulant les grandes fonctions biologiques. Elle permet l'analyse de ces mécanismes et des conséquences de leurs perturbations à différents niveaux chez l'animal comportemental, physiologique et moléculaire. Nous allons analyser les modifications morphologiques et fonctionnelles des synapses des cellules de Purkinje induites par le changement de leurs identités moléculaires. Pour cela, nous avons développé des outils moléculaires fonctionnant chez la souris et permettant d'éliminer en grande partie les molécules que nous suggérons être importantes pour les synapses de notre réseau. Nous avons validé ces outils dans des systèmes de cultures cellulaires et nous allons maintenant les injecter dans le cervelet ou l'olive inférieure, soit de souriceaux âgés de moins d'une semaine pour l'étude du « code moléculaire » nécessaire à la formation des synapses, soit chez l'adulte pour l'étude du « code moléculaire » requis pour leur maintien.

Dans ce projet, nous utiliserons 810 souriceaux et 450 souris adultes, soit un total de 1260 souris sur 5 ans. La règle des trois R [1) Réduction, 2) Raffinement, 3) Remplacement] est appliquée dans la mesure où 1) le projet est conçu pour limiter le nombre de souris au minimum dans la limite de ce qui est permis pour obtenir des résultats scientifiquement valides (détermination du nombre d'animaux grâce à l'outil statistique BiostaTGV et grâce à l'évaluation rétrospective qui est en cours pour un projet similaire validé en 2014). Différentes analyses pourront être réalisées sur le cerveau de chaque animal. Par exemple, la détermination du site d'injection des outils moléculaires, de leur efficacité et l'analyse morphologique des synapses. 2) 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 durable que pourraient ressentir les animaux. Ainsi, les techniques douloureuses et stressantes seront minimisées grâce à l'utilisation d'analgésiques et de techniques d'anesthésie lors des procédures invasives. L'utilisation de souris blanches considérées comme de très bonnes mères permettra d'éviter le rejet des souriceaux manipulés. Les souriceaux et souris manipulés seront observés chaque jour jusqu'à la fin des expériences. Tout signe de stress ou de douleur impliquera une élimination de la procédure expérimentale. 3) Le développement de connexions entre différentes régions du cerveau ne peut pas être reproduit par des systèmes cellulaires. En effet, nous avons tenté de réaliser des co-cultures de neurones du cervelet et de l'olive inférieure mais sans succès, et aucune publication scientifique n'a montré la faisabilité d'une telle co-culture. L'utilisation d'animaux vivants est donc nécessaire pour notre projet. Ce projet est basé sur nos expériences précédentes également réalisées chez le souriceau ou la souris adulte et intégrées dans un projet validé par un comité d'éthique en expérimentation animale en 2014.

Nous avons fait évoluer nos procédures selon la législation en vigueur pour l'expérimentation animale.

14367 Les infections bactériennes pulmonaires sont responsables de nombreuses pathologies associées à une mortalité majeure. C'est le cas de la tuberculose (TB) qui est l'une des trois pathologies infectieuses à agent étiologique unique les plus meurtrières. Elle est causée par l'infection par voie aérienne de la bactérie *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) responsable de manifestations essentiellement pulmonaires. On retrouve également des pathologies nosocomiales auxquelles sont associées de nombreux pathogènes dont *Pseudomona aeruginosa* ou *Klebsiella pneumoniae* et enfin la mucoviscidose dans laquelle on retrouve également l'implication de mycobactéries comme *Mycobacterium abscessus* ou encore *Pseudomonas aeruginosa*. Parmi les axes principaux de recherche dans ces pathologies figurent la recherche de cibles thérapeutiques (sur l'hôte ou la bactérie elle-même) ainsi que la recherche d'un vaccin ou d'un nouveau vaccin plus efficace que le vaccin actuel (exemple du BCG pour TB). Notre équipe contribue à ces deux axes de recherche en tentant de comprendre les mécanismes de l'interaction hôte-pathogène dans ces pathologies, ce qui implique l'utilisation de modèles cellulaires et animaux d'infection par ces bactéries. Par ailleurs, notre intérêt se porte sur l'immunité pulmonaire en général et en particulier sur l'impact des populations de cellules lymphoïdes déjà présentes dans les poumons à l'initiation des infections. Le présent projet s'inscrit dans ce cadre et vise à étudier l'implication de cellules lymphoïdes innées [cellules MAIT (mucosal associated lymphoid T cells) et ILCs (innate lymphoid cells)], au cours de l'interaction hôte-bactérie dans différents modèles murins présentant des sensibilités différentes à ces infections, ainsi que des déficits développementaux sur les cellules d'intérêt pour nos études. Le nombre maximal d'animaux utilisé sera de 12080 souris se répartissant en 4320 souris C57BL/6, 480 souris C3HeB/FeJ, 480 souris 129Sv, 480 souris CBA, 480 souris RORgt-GFP, 480 souris CAST, 480 souris CR57BL/6-MR1°, 480 souris CAST-MR1°, 1440 souris Rag°gamma c° et 2000 souris Rag° Afin de s'inscrire dans la logique des 3R, nous avons intégré 4 étapes dans notre raisonnement.

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

Ensuite, certaines étapes de nos projets (clairement identifiées dans les procédures détaillées) pourront en effet être suivies de décisions de poursuite ou d'arrêt de l'étude en fonction des promesses offertes par les résultats. Ce point est important car si le nombre de souris demandé est conséquent, il faut noter qu'il s'agit d'un nombre théorique maximal puisque ces premières expériences permettront de déterminer quelles lignées de souris seront utilisées et quelles expériences seront poursuivies en fonction des résultats. Le nombre final réel est donc difficile à évaluer à ce stade mais sera largement inférieur au nombre total théorique présenté ici.

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

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

Le stress et la douleur animale sont présents à trois niveaux dans nos expériences i) lors des instillations intranasales ou des injections intraveineuses réalisées dans les procédures; ii) lors de l'inflammation pulmonaire chronique induite par l'infection et iii) lors de l'infection induite chez des animaux immunodéficients. La seule étape douloureuse attendue est l'injection intraveineuse réalisée sous anesthésie et complétée par une analgésie. Les instillations intranasales nécessaires pour le projet seront réalisées sous anesthésie (isoflurane) pour prendre en charge le stress. Ces instillations sont réalisées sans analgésiques car non associées à de la douleur. Une surveillance journalière du stress et de la douleur (non attendue dans nos conditions) au cours et suite à ces instillations ainsi que lors du développement des infections expérimentales sera réalisée. Cette

surveillance sera portée à deux fois par jour pour les lignées immunodéficientes. Les points limites précoces choisis sont les changements dans l'aspect physique (attitude prostrée, poil terne), le comportement des animaux (isolement, déplacements limités) et la perte de poids (>15%). Tous les animaux sont hébergés selon les normes d'éthique en vigueur et disposent d'enrichissement lors de la stabulation.

14368 Les chevaux au pâturage sont infestés par une faune variée de parasites digestifs. Parmi ces parasites, les cyathostomes peuvent toucher jusqu'à 100% des chevaux. Les cyathostomes sont responsables de retard de croissance, de perte de poids, mais aussi d'un syndrome de cyathostomose larvaire dû à l'émergence en masse de stades larvaires enkystés dans la muqueuse colique où ils séjournent durant leur cycle de développement. En cas d'échec de traitement, le pronostic clinique peut s'assombrir jusqu'à la mort des animaux dans 30% des cas au moins.

Les interactions entre la communauté de cyathostomes (entre 10 à 20 espèces par cheval) et les micro-organismes de la flore digestive sont très mal comprises. L'intérêt de ce savoir est double. D'une part, savoir reconnaître les perturbations de flore associées aux cyathostomes permettrait de mieux diagnostiquer l'infestation sur le terrain et de mieux corriger ces perturbations pour favoriser le bien-être de l'hôte sans avoir recours aux anthelminthiques. D'autre part, les bactéries ne sont pas neutres et produisent des composés toxiques pour les parasites. C'est pourquoi l'identification d'interactions négatives entre familles bactériennes et espèce de cyathostome pourrait aboutir à l'identification de toxines aux propriétés anthelminthiques.

Le projet portera sur 46 ponettes. Un premier test sur 6 ponettes permettra d'établir la dose infestante optimale. L'expérimentation portera ensuite sur 40 ponettes réparties en 4 lots de 10 individus. Seules 30 ponettes seront infestées expérimentalement afin de mimer les conditions rencontrées au pâturage.

Réduction : l'utilisation de 10 individus par lot, correspond à l'effectif minimal nécessaire à la mise en oeuvre de variations significatives.

Raffinement : les ponettes sont maintenues en box par paires et disposent d'une aire de détente. Par ailleurs la dose infestante est minimisée pour correspondre à la charge parasitaire classiquement rencontrée en conditions naturelles. Les gestes correspondent à des pratiques d'élevage et sont effectués par du personnel qualifié, sur des animaux maintenus avec une contention appropriée.

Remplacement : il n'existe pas de système *in vitro* pouvant reproduire l'interaction entre des cyathostomes adultes et le microbiote du colon. La balance bénéfice/coût est maximiser puisque cette expérimentation permettra d'identifier de nouvelles pistes de diagnostic ou de contrôle, tout en minimisant le nombre d'animaux utilisés. Les procédures appliquées miment par ailleurs la situation naturelle d'infestation ou des pratiques d'élevages (coproscopie, prise de sang).

14369 Contexte. La technologie des ultrasons focalisés, connue par l'acronyme HIFU, permet de détruire des tissus pathologiques sans incision. Une sonde émet des ultrasons qui traversent la peau et se concentrent sur le tissu à traiter où ils induisent un échauffement local important. Le geste est guidé en temps réel par échographie. Les HIFU sont déjà utilisés de manière commerciale pour traiter notamment les cancers de la prostate, les fibromes utérins et de nombreuses autres applications cliniques sont en développement. Dans le cadre du traitement des varices, ils constituent une alternative ambulatoire et non-invasive aux méthodes chirurgicales et endo-veineuses. Le but de cette étude est de caractériser la sécurité d'un nouveau mode d'application des HIFU ayant pour but de diviser par deux la durée de traitement des varices.

Objectif général. Valider l'efficacité et la sécurité d'un nouveau mode d'application des HIFU pour la coagulation des veines dans le contexte du traitement des varices.

Modèle animal et méthode Des traitements HIFU seront délivrés sur des veines superficielles des pattes antérieures de trente brebis. Ce modèle est pertinent pour atteindre l'objectif de ce projet. Les preuves obtenues sur ce modèle ont notamment permis de justifier un essai clinique sur l'homme en 2017 avec un premier mode d'application.

L'emploi d'animaux est rendu nécessaire par les limites des modèles numériques et ex vivo et la nécessité d'effectuer un suivi à distance pour suivre l'évolution de la zone traitée.

La première phase de l'étude impliquera 15 brebis réparties en 3 groupes. Seule la durée de suivi différera selon les groupes elle sera respectivement de 30 jours, 60 jours et 90 jours. Les brebis seront anesthésiées et on appliquera l'énergie HIFU sur les veines par voie externe.

Après traitement, les brebis seront réveillées. Pendant la durée de suivi, les animaux feront l'objet d'un examen général quotidien et d'un examen de certains points d'attention particuliers à des dates prédéfinies.

La seconde phase de l'étude impliquera 15 brebis réparties en 3 groupes. Lors de cette phase de l'étude, chaque veine sera traitée deux fois, à D0 et respectivement D30, D60 ou D90 selon le groupe. Ceci vise à prendre en compte la nature chronique de la pathologie qui implique des traitements répétés. Suite au premier traitement, les brebis feront l'objet d'un examen général quotidien et d'un examen de certains points d'attention particuliers à des dates prédéfinies. Suite au second traitement, les brebis seront suivies de la même manière pendant une période de 90 jours. Dans le cadre du raffinement de l'étude (règle des 3R), une brebis qui resterait prostrée ou aurait d'importantes difficultés à marcher serait euthanasiée et autopsiée.

A la fin de chaque phase de l'étude, les brebis seront anesthésiées et un examen échographique de chaque patte traitée sera réalisé avant euthanasie. Dans le but de réduire le nombre d'animaux utilisés (règle des 3 R), des traitements HIFU seront réalisés lors de l'anesthésie pré-sacrifice sur la face interne des pattes afin d'acquérir des données complémentaires liées à l'échauffement de la peau. Les brebis seront ensuite sacrifiées.

Les veines traitées ainsi que des portions de muscles situées en regard de la veine seront prélevées et envoyées pour analyse histologique. Les durées de suivi sont justifiées d'une part par la nécessité de réaliser un suivi clinique pour faire la preuve qu'aucune complication n'a lieu, et d'autre part par la nature des phénomènes à observer en histologie.

Dans le cadre de la règle des 3 R, les jugulaires seront également prélevées pour réaliser des traitements HIFU ex vivo pour quantifier précisément la température atteinte lors des traitements. Le prélèvement de ces veines après euthanasie nous permet donc de réduire le nombre d'animaux nécessaires pour compléter nos preuves précliniques.

14370 Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) sont des pathologies chroniques qui affectent le tractus gastro-intestinal. Elles comprennent la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique. Ces pathologies affectent près de 2 millions de personnes en Europe. Les MICI se déclenchent chez des personnes avec une susceptibilité génétique sous l'influence de facteurs environnementaux. Parmi ces facteurs environnementaux, l'alimentation modifie le risque de développer une MICI. Les MICI se composent de poussées inflammatoires entrecoupées de phase de rémission. La répétition des phases inflammatoires entraîne des séquelles anatomiques comme la fibrose intestinale. Il n'existe actuellement pas de traitement pour la fibrose intestinale et les patients doivent alors subir une chirurgie. Pour mieux comprendre le processus de fibrose et identifier de nouvelles cibles thérapeutiques, nous testerons deux approches pour étudier la fibrose intestinale (i) nous testerons l'influence de l'alimentation sur le développement de la fibrose, (ii) nous utiliserons des molécules pharmacologiques pour inhiber des cibles thérapeutiques déjà validées dans des fibroses d'autres organes que l'intestin. Dans ce contexte, nous souhaitons évaluer l'effet de différentes approches pharmacologiques et/ ou nutritionnelles sur le développement de la fibrose intestinale chez le rongeur. La fibrose intestinale sera étudiée chez le Rat Sprague-Dawley ou chez la Souris C57BL/6 par l'induction d'une colite chronique induite chimiquement (TNBS ou DSS). Pour reproduire la maladie de Crohn, un modèle TNBS sera utilisé chez le rat car il reproduit l'inflammation transmurale observée chez le patient. Les rats seront utilisés pour la colite au TNBS car ils supportent mieux les anesthésiées répétées nécessaires pour ce modèle expérimental et l'évaluation de la fibrose intestinale par Colo-IRM. Pour reproduire la rectocolite hémorragique, le modèle DSS sera utilisée chez la souris. Différentes approches nutritionnelles ou thérapeutiques seront évaluées. Pour certains lots de rats, la fibrose intestinale pourra être évaluée par IRM après

anesthésie de l'animal. Après la mise à mort de l'animal par surcharge anesthésique, le colon et le sang seront prélevés et des paramètres de fibrose intestinale seront alors évalués. Les modèles de colite expérimentale provoquent de la douleur chez l'animal mais une administration d'analgésiques sera réalisée quotidiennement tout au long du protocole. Pour répondre à cette question, nous utiliserons en totalité 440 animaux (200 rats et 240 souris) sur 5 ans.

Notre stratégie des 3 R

REMPLE Avant d'être testé *in vivo*, les nutriments et/ou molécules thérapeutiques seront évalués *in vitro* dans un modèle de fibrose intestinale CCD-18Co en présence de TGFβ.

RAFFINER Habituation Avant de commencer les expérimentations, les animaux seront acclimatés au minimum une semaine. Hébergement amélioré L'hébergement sera amélioré par la mise à disposition d'un abri en polycarbonate permettant aux animaux de s'isoler ou non de leurs congénères. Les animaux seront disposés dans une cage ordinaire au lieu d'une cage métabolique. Afin de permettre des interactions avec leurs congénères, les souris seront disposées à quatre ou cinq par cage car une étude a montré que les souris vivants à quatre dans une cage subissaient un stress minimal comparativement à ceux regroupés à deux ou à huit. Le milieu de la cage sera enrichi par la mise à disposition de jouets.

Anesthésie et analgésie Pour ne pas provoquer d'hypersensibilité viscérale chez les animaux contrôles, les animaux des séries TNBS ne recevront d'injection rectale de la solution véhicule, ie l'éthanol mais une injection rectale de solution saline. En effet, il a été montré qu'une injection rectale de TNBS induit de la douleur viscérale plus de 2 semaines après l'injection. Pour limiter l'intensité et la durée de la souffrance animale, le nombre d'injections de la solution hapténisante des séries TNBS a été limitée à 3 au lieu des 6 injections décrites dans le protocole initial. Les animaux seront anesthésiés lors de l'induction de la colite et lors de l'examen IRM. La douleur des animaux sera évaluée et les animaux recevront un traitement analgésique par le tramadol (20 mg/kg) tout au long du protocole. Point d'arrêt anticipé Deux points d'arrêts anticipés ont été définis le premier en fonction de la perte de poids (perte de poids supérieure à 15% en 3 jours) et le second en fonction de la réponse à une échelle de grimace adaptée à l'espèce animale utilisée.

REDUIRE Pour diminuer le nombre d'animaux utilisés, plusieurs approches combinées ont été prévues (i) L'utilisation d'espèces d'animaux utilisés à des fins scientifiques, caractérisés par une faible variation génétique permet de limiter la variabilité de la réponse biologique et par conséquent le nombre d'animaux. (ii) L'effectif de chaque groupe a été déterminée par une approche statistique en prenant comme critère principal le score histologique. (iii) L'utilisation de techniques non invasives comme l'imagerie par IRM permettra une étude longitudinale du même animal et diminue ainsi le nombre d'animaux. (iv) Nous avons fait le choix de tester les molécules thérapeutiques ou les nutriments uniquement sur les animaux colitiques et par conséquent de limiter les groupes contrôles au strict minimum. (v) Les données obtenues chez des animaux contrôles seront réutilisés autant que possible. Par exemple, des échantillons de colon sont préservés dans le laboratoire et indiqués dans une base de données communes à notre Unité et peuvent ainsi être réutilisés au cours d'un autre protocole.

Ce projet de Recherche va permettre de répondre à des questions fondamentales dans le contexte de la fibrose intestinale des patients atteints de MICI. Peu d'études s'intéressent à l'interaction alimentation et microbiote dans le contexte de la fibrose intestinale. Bien que des progrès majeurs aient été réalisés au cours des 2 dernières décennies pour mieux contrôler l'inflammation dans les MICI, il n'y a pour l'instant de traitement disponible pour prévenir ou inhiber la fibrose intestinale. La fibrose intestinale conduit le patient à subir de la chirurgie et parfois de manière répétée pour le traitement des sténoses.

14371 En France, le cancer colorectal se situe au troisième rang des cancers les plus fréquents le deuxième chez les femmes et le troisième chez les hommes. Il survient en grande majorité chez les personnes âgées de 50 ans et plus. Selon les estimations, le nombre de cancers colorectaux devrait augmenter dans les prochaines années pour atteindre 45 000 nouveaux cas annuels en 2020. Malgré le nombre croissant de molécules thérapeutiques, les progrès thérapeutiques restent

modestes. L'un des principaux obstacles est inhérent à l'absence d'une délivrance spécifique des médicaments dans le tissu tumoral. En outre, la majorité des substances thérapeutiques engendrent des effets secondaires liés à des effets toxiques au niveau des tissus sains. Une autre limitation importante est la présence de barrières biologiques (par exemple, la barrière endothéliale) qui limitent l'extravasation de molécules thérapeutiques en doses suffisantes vers le tissu cible.

De nouvelles méthodes basées sur l'utilisation combinée de microbulles de gaz et d'ultrasons fournissent des alternatives thérapeutiques sans précédent pour obtenir une action thérapeutique locale, efficace et non-invasive. En effet, l'activation de ces microbulles par ultrasons à proximité de la barrière hémato-tumorale, augmente transitoirement leur perméabilité et permet ainsi le passage et la pénétration de molécules thérapeutiques dans les tissus pathologiques. Grâce à ce passage augmenté, la biodisponibilité de ces molécules dans les zones cibles se trouve amplifiée, élément majeur pour une meilleure efficacité thérapeutique.

Les virus oncolytiques ou virus qui détruit les cellules tumorales sont une nouvelle classe d'agent thérapeutique pouvant être une alternative au traitement des cancers. Par définition, un virus oncolytique est un virus qui démontre une réplication spécifique dans les cellules tumorales induisant leur destruction, avec une faible voire aucune cytotoxicité sur les tissus dits « sains ».

Dans ce projet, nous allons combiner à la fois les virus oncolytiques et les microbulles de gaz et d'ultrasons afin d'augmenter la délivrance des virus dans la tumeur et ainsi potentialiser leurs efficacités.

Pour les expériences que nous mènerons nous serons vigilants à mettre en œuvre la règle des 3R - Réduire le nombre de souris utilisées avant d'être testés chez l'animal, les virus-candidats médicaments auront été évalués *in vitro* sur des modèles cellulaires de tumeurs humaines et murines établies et caractérisées, ainsi que dans des cellules primaires (non tumorales) pour sélectionner les virus-candidats médicaments ayant une activité anti-tumorale et ne présentant pas de cytotoxicité.

Après analyse de notre service de bio statistique, l'obtention de résultats statistiquement robustes nécessite des groupes de 15 animaux.

- Remplacer du fait de l'absence de système *in vitro* comportant tous les éléments pouvant interférer avec la réplication virale, et permettant de mimer leurs interactions et leur mode d'action, l'emploi de modèles animaux est incontournable.

Un nombre maximal de 724 souris est envisagé pour ce projet.

- Raffiner Tout au long de leur vie, une attention particulière est portée au bien-être des animaux en particulier par un enrichissement de leur milieu de vie qui leur permet d'assouvir les comportements liés à leur espèce, tel que du matériel de nidification. Les animaux sont hébergés en groupes sociaux pendant toute la durée des expérimentations, dans le but de préserver les interactions sociales entre congénères, La réalisation par des techniciens rompus à ses manipulations garantit la bonne reproductibilité des expériences et un suivi optimal du bien-être des animaux.

Les procédures expérimentales seront arrêtées le plus précocement possible sur la base de critères généraux (poids, comportement des souris) et tumoraux (volume, localisation, aspect de la tumeur). Pour toute technique le nécessitant, une anesthésie est prévue dans ce projet.

14372 Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est la forme la plus fréquente de cancer du foie, et représente la deuxième cause de décès liée au cancer dans le monde. Le CHC survient dans près de 80% des cas sur des foies cirrhotiques et progresse le plus souvent dans un environnement inflammatoire. Dans ce contexte, nous nous intéressons au rôle de l'Interleukine (IL)-27. L'IL-27 est une cytokine principalement produite par les cellules immunitaires et dont l'expression a été mise en évidence dans de nombreux cancers. L'IL-27 présente des propriétés anti-tumorales en se fixant sur son récepteur WSX-1. Ce récepteur est majoritairement exprimé par des lymphocytes et des cellules épithéliales. Les effets anti-tumoraux de l'IL-27 peuvent être directs sur la tumeur comme dans le cancer de la prostate ou le mélanome, ou indirects en ciblant les lymphocytes T et en augmentant leur cytotoxicité à l'égard des cellules tumorales comme dans le cas des cancers du côlon et du

poumon. Dans le foie, l'activation de l'axe IL-27/WSX-1 conduit à des effets anti-fibrosants et anti-viraux.

En revanche, le rôle anti-tumoral de l'IL-27 et de son récepteur WSX-1 dans le CHC n'a pas été étudié.

Nous avons démontré chez l'Homme, que l'expression de WSX-1 est perdue dans le CHC, et que cette perte d'expression est corrélée à un mauvais pronostic de la maladie. De plus, nous avons démontré que cette perte d'expression est associée à une surexpression d'un microARN non codant le miR-324. Ce dernier est capable de reconnaître l'ARNm codant pour WSX-1 et en s'y fixant, il conduit à sa dégradation. Ainsi, l'objectif de cette étude est de développer une nouvelle stratégie thérapeutique dans le CHC qui est basée sur la neutralisation du mir-324 afin de restaurer les propriétés anti-tumorales de l'IL-27 dans ce cancer.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous proposons d'inhiber le mir-324 à l'aide d'un inhibiteur spécifique appelé antagomir dans un modèle murin immunocompétent de CHC induit par un agent génotoxique, le diethylnitrosamine (DEN). Cessouris seront ainsi traitées avec un antagomir spécifique du mir-324 et par IL-27.

Pour l'étude complète, un nombre total de 232 souris seront utilisées.

Règle des 3Rs (Réduire, Remplacer, Raffiner)

1/ Remplacer les animaux

Pour l'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans la carcinogénèse, l'utilisation de modèles de tumeurs *in vivo* est indispensable, surtout lorsque l'on s'intéresse à l'impact du microenvironnement inflammatoire sur le développement tumoral. Actuellement, les résultats préliminaires de notre équipe ont montré que la perte d'expression de WSX-1 est retrouvée dans 63% des cas de CHC chez l'Homme et qu'elle est corrélée à un mauvais pronostic du CHC. De plus, cette perte d'expression a été associée à la surexpression du mir-324-5p chez l'Homme et *in vitro* dans plusieurs expérimentations. Il est donc primordial de valider les résultats déjà obtenus chez l'Homme et *in vitro* en réalisant une étude *in vivo* sur un modèle murin de carcinogénèse hépatique afin d'envisager un nouveau traitement ciblant la voie anti-tumorale IL-27/WSX-1 dans le CHC. Par ailleurs, afin de vérifier si la stratégie thérapeutique proposée, combinant plusieurs thérapies, est pertinente, il est nécessaire de réaliser cette étude préclinique sur un nombre restreint d'animaux (98 souris mâles).

2/ Réduire le nombre d'animaux utilisés

Pour réduire le nombre de souris utilisées nous allons réaliser une procédure pilote utilisant un nombre restreint d'animaux (80 souris), qui nous permettra de déterminer les meilleures conditions expérimentales. Un nombre minimum d'animaux est nécessaire dans chaque lot afin de pouvoir valider les résultats de façon statistique. Nous récupérerons un maximum de données sur une même souris (nombre et taille des tumeurs formées et leur caractérisation). Cette méthode nous permettra de réduire le plus possible le nombre de souris utilisées dans l'étude pré-clinique (152 animaux), tout en préservant la qualité de la recherche menée.

3/ Raffiner les méthodes

Après la première injection du DEN en intrapéritonéal, les souriceaux seront immédiatement replacés auprès de leurs parents afin d'éviter tout stress supplémentaire. Le sevrage sera classiquement réalisé par les zootechniciens à 3 semaines de vie. Les souris seront par la suite hébergées par un maximum de 5 animaux par cage de taille réglementaire pour réduire le stress, avec eau et nourriture *ad libitum*. Les souris seront euthanasiées dans le cas où un comportement anormal est observé (isolement, position recroquevillée, dos arrondi, respiration pénible, pelage ébouriffé, pâleur des yeux, oreilles peau, yeux larmoyants, rachis proéminent).

14373 Les facteurs environnementaux, et plus particulièrement la pollution, peuvent jouer un rôle prépondérant dans le développement de pathologies chroniques intestinales telles que le cancer colorectal (CCR). Parmi ces facteurs environnementaux, les particules de dioxyde de titane (TiO₂) sont particulièrement préoccupantes en raison de leurs propriétés cancérigènes et de leur ubiquité

dans l'environnement. Elles sont abondamment utilisées dans les industries pharmaceutiques, de la cosmétique ou encore de l'agroalimentaire (e.g. colorants alimentaires, médicaments, crèmes solaires, dentifrices, confiseries) pour leurs qualités opacifiantes, blanchissantes et protectrices contre les rayons UV. Le système digestif serait ainsi particulièrement sensible au TiO₂ via l'ingestion de produits contaminés. Le bon fonctionnement du système digestif est en grande partie lié à la présence d'une flore microbienne extrêmement abondante et complexe, appelée microbiote intestinal. Toute altération de la structure et/ou des fonctions du microbiote intestinal peut donc contribuer à l'apparition de maladies chroniques digestives en induisant une dysbiose et en favorisant potentiellement l'émergence de pathogènes tels que les bactéries *Escherichia coli* B2 dont la prévalence dans le microbiote intestinal humain est augmentée dans les pays industrialisés et l'implication dans le CCR est clairement démontrée. Dans 80% des CCR chez l'Homme, un gène suppresseur de tumeur, le gène *apc* (Adenomatous Polyposis Coli), a été retrouvé muté. Des souris porteuses d'une mutation sur le gène *Apc* et nommées APCMin/+, développent spontanément des tumeurs intestinales et sont ainsi devenues un modèle murin de référence pour l'étude du CCR. L'objectif de ce travail est donc de caractériser les modifications histologiques (présence ou non d'une inflammation) au niveau de la muqueuse intestinale ainsi que les altérations des populations bactériennes de l'écosystème digestif en réponse à une exposition à des particules de TiO₂, mais également d'étudier l'impact de ce facteur environnemental sur la capacité de colonisation des *E. coli* B2 au niveau de la muqueuse intestinale. Pour des raisons éthiques, l'étude de l'effet des particules de TiO₂ sur le développement de CCR ne peut se faire chez l'Homme. De plus, ce projet nécessite des expositions étalées sur le temps et ne peut donc se réaliser avec des biopsies de patients atteints de CCR. Cette étude nécessite donc l'utilisation d'un modèle murin adapté et indispensable le modèle APCMin/+. Il n'y a, à ce jour, aucune méthode alternative pour étudier les risques carcinogènes de polluants environnementaux sur le développement de CCR et sur l'infection par des pathogènes fortement associés à ces cancers. Le nombre estimé d'animaux est de 384 souris sur une période de 5 ans. Ce nombre est réduit au minimum dans la mesure où cela ne compromet pas les objectifs du projet et a ainsi été établi selon les respects éthiques de la règle de 3R "remplacer, réduire, raffiner". Tous les animaux doivent disposer d'un espace suffisant pour leur permettre d'exprimer un répertoire de comportements normaux. Ils bénéficieront ainsi d'un enrichissement environnemental adapté à leurs besoins spécifiques avec notamment la possibilité de se cacher ou de s'occuper (maisonnettes, lamelles de cartons compressées). A long terme, les résultats générés par cette étude devraient pouvoir permettre une meilleure appréhension des risques carcinogènes engendrés par la présence ubiquitaire grandissante de polluants environnementaux, ainsi que la mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques.

14374 Actuellement, les biotechnologies de l'embryon sont largement utilisées par les entreprises de sélection bovines afin d'accroître le progrès génétique par la réduction de l'intervalle entre générations et l'augmentation de l'intensité de sélection. La production *in vitro* d'embryons après ponction ovocytaire, couplée au génotypage, est théoriquement l'approche la plus efficace. Toutefois, les conditions de production *in vitro* sont sub-optimales et altèrent globalement la compétence au développement des embryons : alors que le taux de gestation atteint les 60% pour des embryons produits *in vivo*, la réimplantation d'embryons génotypés produits *in vitro* et congelés ne conduit à une gestation que dans moins de 35% des cas. Ces résultats engendrent d'importantes pertes économiques et de progrès génétique qui rendent nécessaire une optimisation des conditions de production *in vitro* en s'appuyant notamment sur les dernières avancées scientifiques réalisées en termes de connaissance du micro environnement physiologique. Au cours d'un précédent projet de recherche, deux nouveaux protocoles de production d'embryons *in vitro* ont été développés. Ces nouveaux protocoles ont donné des résultats prometteurs en utilisant des critères d'évaluation *in vitro* et doivent désormais être validés par mesure des taux de gestation après transfert dans des femelles receveuses. Le projet présenté dans ce document vise donc à obtenir des données préliminaires en transférant des embryons produits *in vitro* selon 3 protocoles différents (témoin et les 2 protocoles optimisés) dans 60 femelles receveuses (3 lots de 20 receveuses). Pour les génisses vides au 1er transfert d'embryon, un 2nd transfert sera réalisé. Ce projet respecte la règle des 3R :

Remplacement : des critères d'évaluation *in vitro* ayant déjà été utilisés, la validation finale exige le recours à l'animal.

Réduction : Au total, 60 femelles seront utilisées dans ce projet. Compte-tenu de ces effectifs limités, il est peu probable que le dispositif puisse mettre en évidence une différence significative de taux de gestation entre les lots. Cette première étape de validation permettra essentiellement d'obtenir des données préliminaires avant d'envisager une validation à plus large échelle, en conditions de terrain.

Raffinement les génisses utilisées dans ce projet seront placées sous surveillance quotidienne (activité, comportement) et hébergées dans une stabulation répondant aux normes de bien-être animal chez cette espèce (accès aisé à l'auge et aux points d'abreuvements, présence de tapis caoutchouc derrière pour le confort des aplombs, accès à des brosses latérales et dorsales). De plus, les procédures utilisées dans le cadre de ce projet ne sont pas susceptibles d'engendrer de stress ou de douleur. Néanmoins, une anesthésie épidurale sera réalisée préalablement au transfert d'embryons.

14375 La greffe de moelle osseuse allogénique, c'est-à-dire réalisée avec un donneur volontaire sain de moelle osseuse ou de cellules souches mobilisées reste le seul traitement permettant d'obtenir la guérison dans les leucémies aiguës et certains cancers. L'effet anti-tumoral de la greffe est lié à la reconnaissance des cellules leucémiques ou cancéreuses du receveur par le système immunitaire du donneur qui déploie une attaque cellulaire dirigée contre les cellules malades du receveur reconnues comme étrangères et permet ainsi la guérison. Malheureusement, les cellules du système immunitaire du donneur sont incapables de faire la différence entre une cellule malade et une cellule saine qui porterait les mêmes caractéristiques immunologiques. L'attaque des cellules normales de certains organes du receveur est responsable de la maladie du greffon contre l'hôte (GVH pour « Graft-versus-Host » en anglais). Cette complication de la greffe de moelle osseuse se développe dans 50% des cas en moyenne et est à l'origine de dysfonctionnements d'organes sévères conduisant souvent au décès des patients. Il est donc urgent de trouver des stratégies qui permettraient de diminuer le risque de développer une GVH sans altérer l'effet anti-tumoral de la greffe.

Parmi les stratégies intéressantes l'injection de cellules régulatrices capables de diminuer la GVH, est la voie de recherche la plus prometteuse. Ainsi, les Cellules Souches Mésoenchymateuses (CSM) prélevées dans la moelle osseuse de donneur (CSM-MO) ont été rapportées comme potentiellement efficaces dans la littérature chez les patients atteints de GVH sévère. Cependant le recueil de CSM-MO nécessite un prélèvement de moelle osseuse sous anesthésie générale d'un donneur, avec un rendement d'autant plus faible que l'âge du donneur avance. La gelée de Wharton (tissu conjonctival du cordon ombilical) contient des CSM qui ont une plus grande capacité d'auto-renouvellement, prélevable au décours de l'accouchement sans controverse éthique et constitue ainsi une source alternative de CSM. L'isolement des CSM à partir de la gelée de Wharton, et leur expansion selon les bonnes pratiques cliniques est maîtrisée par notre équipe. Ces CSM-GW ont été largement étudiées et possèdent les mêmes propriétés morphologiques, phénotypiques, immunogéniques et immunorégulatrices que les CSM-MO. Après avoir étudié et déterminé *in vitro* les mécanismes d'interaction des CSM-GW avec le système immunitaire, nous souhaitons maintenant analyser leur effet *in vivo* dans un modèle pré-clinique de GVH, par injection de greffons de cellules sanguines mononucléées humaines dans la souris. Ce modèle de xénogreffe est le modèle de référence dans la littérature pour toute étude pré-clinique de cellules humaines injectées comme thérapie cellulaires dans la greffe et ne peut donc être remplacé par un autre modèle. La souris utilisée appelée NSG pour NOD.Cg-Prkdcscid112rgtm1Wjl/SzJ ou dite NOD/SCID/Gamma-c KO est dépourvue de système immunitaire excepté quelques monocytes et macrophages. Elle est donc capable d'accepter un greffon de cellules sanguines humaines, et de développer une maladie de type « GVH ». Nous souhaitons suivre l'évolution de ces CSM-GW, leurs interactions avec l'immunité adaptative, leurs effets protecteurs vis-à-vis de la GVH et leur innocuité dans ce modèle pré-clinique. Les souris seront donc hébergées dans un environnement protégé, c'est à dire dans un portoir ventilé, cage avec capot et filtre HEPA®, alimentation irradiée et eau stérile.

L'enrichissement du milieu sera assuré par du papier à l'intérieur de chaque cage, préalablement autoclavé, pour maintenir les conditions d'hygiène indispensable. Le projet d'étude *in vivo* permettra de

- Etudier les interactions des CSM-GW avec les cellules de l'immunité du greffon
- Etudier la biodispersion des CSM-GW après injection intra-veineuse
- Suivre cliniquement les souris receveuses avec un score clinique précis permettant de grader la sévérité de la GVH
- Vérifier l'inocuité des CSM-GW *in vivo*

Au total, nous avons élaboré notre projet selon la règle des 3 R : d'une part le modèle utilisé est indispensable pour valider l'étape pré-clinique à ce protocole qui se verra proposé à l'issue en thérapie cellulaire chez les patients allogreffés, d'autre part chaque expérimentation *in vivo* sera interrompue précocément dès qu'il s'agira de déterminer la biodistribution des CSM-GW et des interactions avec le système immunitaire pour ne pas attendre l'installation de la GVH ou dès qu'une significativité statistique sera obtenue entre les groupes. En effet, le projet estime après calcul "a priori" statistique de l'utilisation nécessaire minimale de 102 souris sur 5 ans. Pour limiter le temps d'observation des souris, certaines expérimentations seront arrêtées précocément en post-greffe avec mise à mort de la souris receveuse pour étudier précocément la régulation des cellules de l'immunité du greffon et les signes précurseurs histologiques de GVH. La méthodologie utilisée a défini les points limites pour tout le projet. Ces points limites seront un score de GVH supérieur ou égal à trois, une évaluation de la douleur jugée sévère selon le "Mouse Grimace Scale" et une perte de poids supérieure ou égale à 20%. L'atteinte de ces points limites entraînera systématiquement une mise à mort par asphyxie au CO₂. Tout effet indésirable inattendu entraînera la mise à mort et l'arrêt de l'expérimentation. Aucune expérimentation ne sera poursuivie au-delà de 2 mois post-greffe.

14376 Le vieillissement est un phénomène physiologique responsable de nombreuses pathologies allant de la carcinogénèse en passant par les troubles métaboliques comme le diabète et les maladies neurodégénératives. Il a été montré que l'obésité, phénomène croissant dans la population mondiale, induit une sénescence (ou vieillissement) prématurée et participe à l'aggravation de pathologies comme le cancer du foie et le diabète. Le cancer du foie primaire fait suite à une cirrhose dans plus de 90% des cas. Cette cirrhose, irréversible, causée par une consommation excessive d'alcool, par une infection par le virus de l'hépatite C et de plus en plus de nos jours par une nouvelle pathologie que l'on appelle la stéatohépatite non alcoolique ou NASH en anglais (Non Alcoholic SteatoHepatitis). Ce NASH est associé à une hygiène de vie avec une consommation excessive de graisse mais surtout de sucre d'où son surnom de maladie du Soda. Des études ont montré dans des modèles expérimentaux conduisant à l'obésité et au NASH qu'un vieillissement prématuré au niveau hépatique était observé. Des études ont montrées que la perte d'expression de gène pro-vieillessement pouvait permettre un vieillissement amélioré et une meilleure réponse métabolique. C'est pourquoi nous souhaitons étudier les effets de la modulation d'expression (perte d'expression ou surexpression) d'un gène pro-vieillessement sur l'hépatocarcinogénèse en lien avec le NASH. Le protocole que nous souhaitons mettre en oeuvre a été décrit dans la littérature pour mimer de façon très proche la pathologie humaine au niveau tissulaire et cellulaire. De l'eau sucrée est également utilisée pour se rapprocher le plus possible des habitudes alimentaires qui conduisent à l'apparition du NASH. Lors de ce protocole les souris soumises à une alimentation riche en graisse et en sucre deviendront obèses, toutefois la durée du protocole est suffisamment courte pour que les animaux n'aient pas de souffrance phénotypique au cours de l'expérience. Le but de ce protocole est de montrer que le gène en question peut-être une cible thérapeutique en vue de combattre les effets procancéreux du NASH.

Les retombées dans le domaine de la recherche sont importantes.

Remplacer ce projet est basé sur de nombreuses études *in vitro*, qui nous permettent de savoir précisément les mécanismes mis en jeu. Cependant, à ce stade des recherches, l'utilisation de modèles complexes, i.e. d'animaux vivants, est requise avant d'envisager une application clinique.

Réduire le nombre d'animaux par groupe a été réduit au maximum sans toutefois compromettre l'analyse statistique des résultats. Pour cela nous utiliserons 512 souris réparties de manière égale entre males et femelles.

Raffiner une définition précise de points limites précoces et prédictifs ainsi qu'une surveillance adaptée des animaux permet de limiter l'apparition d'une souffrance ou d'une atteinte de l'état général de l'animal. En cas d'atteinte de ces points limites les animaux sont sortis de l'étude et mis à mort.

14377 Dans les unités de soins intensifs, de chirurgie et de transplantation, les cliniciens sont très souvent confrontés aux conséquences des épisodes ischémiques, c'est-à-dire le manque d'oxygénation des tissus. Ce phénomène peut se révéler dramatique en terme de récupération fonctionnelle des organes touchés avec parfois une issue fatale pour le patient. Ajouté à cela, le phénomène dit de reperfusion, c'est-à-dire la réoxygénation d'un organe venant de subir une ischémie, est tout aussi problématique pour l'organe et même souvent plus dramatique. Les cliniciens sont actuellement en manque de moyens pharmacologiques pour pallier ces atteintes en raison du contexte multifactoriel de stress due à l'ischémie/reperfusion. En partant d'organismes modèles, nous avons identifié une toute nouvelle voie impliquée dans la résistance à l'ischémie chez les espèces animales depuis la mouche jusque chez les mammifères. Cette voie fait intervenir un facteur clé de l'initiation de la synthèse de protéine. Nous avons déjà montré *in vivo* dans des études précédentes que l'inhibition pharmacologique de cette voie chez le rongeur, augmente la tolérance des tissus après un épisode d'ischémie/reperfusion. Chez le cochon, dans un modèle préclinique de transplantation rénale, cette inhibition pharmacologique conduit à une nette amélioration de la récupération fonctionnelle de l'organe greffé à long terme. L'objectif de notre projet est maintenant de décrypter les mécanismes impliqués dans cette toute nouvelle voie de résistance des organes à l'ischémie/reperfusion pour à terme optimiser les protocoles de transplantation chez l'homme, et plus particulièrement déterminer les modifications métaboliques permettant cette protection. Dans ce but, nous devons maintenant expérimenter sur des modèles animaux. En effet, à notre connaissance, il n'existe pas de méthode alternative permettant de répondre à notre problématique en mimant toutes les interactions qui sont mises en jeu dans un organisme entier.

Pour cela, des souris seront prétraitées en injection intrapéritonéale avec le composé pharmacologique permettant la protection à l'ischémie ou son véhicule. Ce composé pharmacologique est connu pour ne présenter aucune toxicité chez l'animal après 7 jours de traitement chez la souris et 72 heures chez le cochon. Ensuite, les paramètres métaboliques de ces animaux seront évalués d'abord en cages métaboliques puis les tissus seront utilisés pour des analyses histologiques, moléculaires et biochimiques. Ce protocole nécessitera 48 souris.

Ce projet se justifie pleinement d'un point de vue scientifique et obéit à la règle des 3R :

Remplacement l'ensemble des expériences *in vitro* possibles ont été effectuées et il s'agit maintenant de valider *in vivo* ces résultats dans un modèle animal présentant un métabolisme général complexe.

Réduction le nombre de souris a été calculé pour limiter les variations inter-individus et atteindre un niveau statistique validé par une analyse prédictive, permettant ainsi de réduire au maximum le nombre d'animaux tout en étant suffisant pour l'obtention de résultats statistiquement exploitables pour trouver un effet significatif. Les différents échantillons pourront être utilisés pour d'autres études.

Raffinement les animaux sont élevés avec un igloo et du coton pour un enrichissement social et matériel. L'agent pharmacologique que nous injecterons n'a présenté aucune toxicité ni chez les rongeurs, ni chez le cochon. Nos souris sont suivies quotidiennement et des méthodes de réduction de la souffrance et des points limites bien identifiés sont prévus.

14378 Le trouble du déficit de l'attention (TDA) est un trouble pédopsychiatrique caractérisé par des problèmes de concentration. On l'appelle trouble du déficit de l'attention avec hyperactivité (TDAH) lorsqu'il s'accompagne d'hyperactivité ou d'impulsivité. Le TDA affecte 3 à 6% des enfants. Le

traitement des TDA est constitué d'une part d'une prise en charge psychologique, éducative, pédagogique et ré-éducative et d'autre part d'un traitement médicamenteux. Les médicaments principalement prescrits pour le TDA sont des stimulants, tels que le méthylphénidate et l'amphétamine et un inhibiteur de la recapture de la noradrénaline, l'atomoxetine. L'efficacité de traitements médicamenteux est réelle. Elle reste néanmoins très perfectible, certains patients répondant mal aux traitements. Par ailleurs, ces composés présentent des effets secondaires chez certains patients, notamment sur le plan du métabolisme, sur le plan cardiaque ou d'ordre psychiatrique. La recherche de traitements plus efficaces et présentant moins d'effets secondaires est donc une nécessité.

Les déficits attentionnels sont également présents dans d'autres pathologies psychiatriques, notamment la dépression ou la schizophrénie, ou neurologiques, par exemple les maladies d'Alzheimer, de Parkinson ou de Huntington. L'efficacité des médicaments existant pour le traitement de ces pathologies et notamment pour le traitement des troubles de l'attention qu'elles impliquent, est à ce jour très insuffisante et justifie la recherche de nouveaux traitements.

Le test opérant de discrimination visuelle à deux choix (Two-Choice Visual Discrimination Task 2-CVDT), permet de mesurer l'attention chez le rat ou la souris. Il est réalisé sur des animaux adolescents (notamment pour l'étude de produits destinés au TDA), adultes ou âgés (notamment pour l'étude de produits destinés à l'Alzheimer ou au Parkinson). Le test se déroule dans des cages de conditionnement appelées cages opérantes. Ces cages sont munies de deux leviers rétractables au-dessus desquelles sont disposées des lampes et d'une mangeoire ou peuvent être délivrées des récompenses alimentaires. L'animal est soumis à des séances journalières d'environ 30 minutes. Durant ces séances, les leviers sont présentés périodiquement et pendant des durées variables (0.5 à 10 s). L'animal doit effectuer rapidement un appui sur celui des deux leviers qui est signalé par une lumière, pour obtenir une récompense alimentaire. Différentes variables sont enregistrées, en particulier le nombre de réponses correctes et le temps de réaction, qui constituent des indices d'attention. Afin de présenter un niveau de motivation suffisant pour réaliser la tâche, les animaux sont soumis à une restriction alimentaire pendant toute la durée du test, soit 3 à 6 semaines.

Après une première phase d'acquisition de la tâche, les animaux reçoivent des administrations des produits testés avant chaque séance. Le nombre d'administrations peut varier entre trois et dix, selon le délai d'action supposé du produit.

Une étude standard comprend 60 animaux répartis en 5 groupes de 12 sujets, qui reçoivent le produit testé à 3 doses, un produit de référence (généralement de l'amphétamine ou du méthylphénidate) et un placebo. Des études peuvent comprendre un nombre plus élevés ou plus faible d'animaux (par exemple pour l'étude d'un nombre de doses supérieur ou inférieur).

Le nombre maximum de produits testés par an est de 20.

Le nombre total maximum d'animaux (rats ou souris) utilisées sur 5 ans est de $6\ 000 = 60 \text{ animaux/étude} \times 20 \text{ études/an} \times 5 \text{ ans}$.

Respect de la règle des 3R

- Réduire. Le nombre total d'animaux utilisés pour une étude est fonction du nombre de groupes et du nombre d'animaux par groupe nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement interprétables.

- Justification du nombre de groupes. Le groupe témoin est nécessaire à chaque expérience compte tenu des variations de performances entre lots d'animaux. Le groupe produit de référence (amphétamine ou méthylphénidate) est nécessaire pour valider l'expérience et pour comparer l'efficacité du produit testé à un produit de référence. Il est généralement nécessaire de tester le produit à trois doses pour mesurer la relation dose-effet, mais un nombre de doses inférieur ou supérieur peut être justifié en fonction de l'état de connaissance du produit.

- Justification du nombre d'animaux par groupe. Compte tenu de la variabilité interindividuelle des variables mesurées dans ce test, ce nombre a été fixé à 12 animaux par groupe. L'utilisation d'un

nombre inférieur d'animaux a une probabilité importante d'entraîner la non-validité de l'étude, conduisant à la refaire, et par conséquent à utiliser un nombre d'animaux plus élevé.

- Justification de la restriction alimentaire. Le test consistant à délivrer des boulettes après des réponses de l'animal, la restriction alimentaire est nécessaire pour que les animaux présentent des performances optimales de réalisation de la tâche. Cette restriction est fonction de l'âge et de l'espèce, rats ou souris. Elle est calculée de façon, à la fois, à permettre un niveau de motivation élevé pour réaliser la tâche et n'entraîner aucune détérioration de l'état physique de l'animal. Cet état physique est évalué tous les jours animal non cachétique et présentant une activité normale dans la cage d'élevage.

- Raffiner. Des animaux présentant des signes de souffrance sont euthanasiés. Outre la motivation éthique conduisant à cette euthanasie, celle-ci est requise pour des raisons expérimentales, la souffrance d'un animal biaisant les variables comportementales mesurées. L'utilisation de traitements pour pallier à cette souffrance est exclue, ces types de traitement étant susceptibles de modifier le comportement des animaux et l'action pharmacologique des produits étudiés.

- Remplacer. Il n'existe pas à ce jour de modèle n'utilisant pas d'animaux ou nécessitant un nombre plus réduit d'animaux ou ayant un degré de sévérité inférieur permettant d'obtenir des informations équivalentes à celles obtenues par le présent modèle.

14379 La Tomographie par Emission de Positons (TEP) est une technique d'imagerie fonctionnelle utilisée couramment par les services de médecine nucléaire. Après l'administration intraveineuse d'une molécule radiomarquée (radiopharmaceutique ou radiotracteur), cette technique aide au diagnostic et à l'évaluation de stratégies thérapeutiques, principalement en oncologie, neurologie et cardiologie. Cependant, le nombre de radiotracteur disponible reste faible et seul le [18F]-FDG est utilisé régulièrement en milieu hospitalier. Cette molécule apporte des informations utiles au diagnostic mais présente des limites dues principalement à son manque de spécificité. Notre équipe, à l'interface de la chimie-radiochimie et de la biologie, développe de nouveaux radiopharmaceutiques marqués au fluor-18 (18F), au carbone-11 (11C) ou au gallium-68 (68Ga) et destinés à la recherche clinique et préclinique en imagerie TEP. Ces travaux sont d'un intérêt majeur et permettent de fournir aux chercheurs et médecins des radiotraceurs toujours plus performants (diagnostic plus précis, suivi thérapeutique, développement de candidats médicaments, ...).

Pour comprendre le devenir d'un radiopharmaceutique dans un organisme vivant, les essais *in vitro* sont pour l'instant insuffisants et l'évaluation ne peut se faire que sur l'animal vivant. Les caractéristiques d'un nouveau radiotracteur sont donc d'abord étudiées sur des animaux sains sa pharmacocinétique (cinétiques de distribution, de métabolisation et d'élimination) et sa spécificité pour la cible biologique, lorsque cette dernière est disponible. Le développement d'un radiopharmaceutique destiné à l'oncologie nécessite de compléter cette caractérisation chez l'animal porteur de tumeur. En effet, l'expérimentation sur ces animaux est le seul moyen disponible aujourd'hui pour évaluer un radiotracteur dans un cadre physiopathologique global, incluant l'ensemble des éléments du microenvironnement tumoral tel que les processus inflammatoires et vasculaires. Cette étude basée sur l'expérimentation animale prend en compte le bien-être animal et les pratiques éthiques, et répond à la règle des 3 R (remplacer, réduire, raffiner) comme décrit ci-dessous.

Avant de débiter les travaux *in vivo*, la capacité du nouveau radiotracteur à interagir avec sa cible est évaluée *in vitro* sur les lignées de cellules cancéreuses étudiées. Après sélection d'un modèle animal pertinent, en fonction de critères techniques, de la littérature scientifique et de son adéquation avec le radiotracteur, les animaux porteurs de tumeurs sont fournis par des laboratoires collaborateurs extérieurs ou sont greffés par nos soins. Les tumeurs étudiées sont implantées par voie sous-cutanée et facilement observables, tant sur le plan de la pousse tumorale que des soins et des différents signes cliniques. Le choix de la souris ou du rat, immunocompétent ou non, est déterminé par le modèle tumoral utilisé, représentatif du type cancéreux étudié. Bien que plus difficile à manipuler, les animaux immunodéficients permettent l'utilisation de lignées tumorales d'origine humaine, donc plus proches de la pathologie ciblée. Les cellules d'origine humaine sont donc implantées sur des rongeurs immunodéficients (souris Nudes, SCID ou Nod-SCID et rats

Nudes), tandis que des rongeurs immunocompétents sont utilisés avec les cellules d'origine murine (souris Swiss, rats Wistar ou rats Wag/Rij par exemple). Les animaux immunodéficients sont hébergés en animalerie EOPS, les autres en animalerie conventionnelle, et dans des cages standards respectant les normes européennes. Le bien-être des animaux est contrôlé 2 fois par jour par du personnel qualifié et les croissances tumorales sont examinées par palpation tous les 2 à 3 jours. Cette surveillance quotidienne et hebdomadaire permet de détecter tous signes cliniques de souffrance (douleur, perte de poids ...) et d'agir rapidement pour mettre fin à cette détresse. Les principes éthiques et les standards de raffinement sont utilisés de la naissance à la mort de l'animal. La caméra μ TEP/ μ TDM et son environnement technique sont adaptés au petit animal (rongeurs), permettant ainsi d'imager *in vivo* le devenir de la molécule tout en respectant les besoins physiologiques de l'animal. Cette technique d'imagerie permet de valider scientifiquement un nouveau radiopharmaceutique avec un nombre réduit d'animaux, en permettant par exemple de comparer sur le même animal le nouveau composé avec un radiopharmaceutique de référence. Pour toutes les injections sous-cutanées (cellules tumorales) ou intraveineuses (radiopharmaceutiques) ainsi que durant l'imagerie, les animaux sont anesthésiés par voie gazeuse avec un monitoring de température et un suivi de la fréquence respiratoire. Les mises à mort, en fin de protocole d'imagerie, se font par du personnel qualifié sous overdose d'anesthésie gazeuse.

L'étude de chaque nouveau radiotracer est séparée en 3 procédures la première, dite « étude pilote », permet d'obtenir des résultats préliminaires attestant de la pertinence du nouveau radiopharmaceutique chez le modèle animal porteur de tumeur choisi. La seconde procédure, dite « étude approfondie », n'est réalisée qu'en cas de réussite de la première procédure et permet de valider ce nouveau radiopharmaceutique, en le comparant à un radiotracer de référence et en démontrant sa spécificité et sa reproductibilité dans le contexte de la pathologie. D'après notre expérience, nous estimons que l'étude de 2 nouveaux radiotraceurs sera menée chaque année, et pour une durée de 5 ans, soit un total de 10. Pour chaque nouveau radiotracer étudié, un maximum 24 animaux seront nécessaires (au minimum 3 en cas d'échec de la première étape), soit un total de 240 animaux au maximum (30 au minimum). Les résultats scientifiques nécessitent d'utiliser un nombre minimum d'animaux (10) par nouveau radiotracer pour que les tests statistiques soient valides, représentatifs d'éventuelles variations inter-individu, et permettant d'appliquer des tests paramétriques (ANOVA puis test Post Hoc) suivant le principe de réduction du nombre final d'animaux à utiliser.

14380 L'objectif de ce projet est d'optimiser des schémas d'associations radiothérapie / immunothérapie / chimiothérapie en adaptant les immunothérapies (IT) et chimiothérapies (CT) aux schémas de fractionnement de la radiothérapie (RT) (nombre de séances de rayons). L'efficacité de ces associations sera évaluée par l'analyse de la croissance tumorale après traitements.

Cette étude repose sur les résultats d'une étude antérieure démontrant que selon le fractionnement de la radiothérapie les types de cellules immunitaires retrouvées dans les tumeurs étaient différents tous comme l'expression de cibles, reconnues par certaines immunothérapies, dont la présence permet l'efficacité de l'immunothérapie associée. Parmi les cellules immunitaires retrouvées certaines ont un rôle inhibiteur de la réponse immunitaire anti-tumorale recherchée. Ces cellules qualifiées d'immunosuppressives pourraient être éradiquées par certaines chimiothérapies. Ceci pourrait alors amplifier l'effet de la réponse immunitaire contre la tumeur.

L'objectif de cette étude est d'évaluer pour deux modèles de tumeurs colorectales l'effet de deux types de fractionnement de la RT (en 3 ou 18 fractions) sur l'induction de l'expression de cibles d'immunothérapie et l'infiltration de cellules immunosuppressives qui peuvent être éliminées par des chimiothérapies spécifiques telle que le 5-Fluorouracile (5-FU) pour un type de cellules nommées MDSC ou le Cyclophosphamide connu pour tuer les cellules nommées Treg. Dans un second temps à la lumière des résultats obtenus lors de cette première étape, nous évaluerons l'efficacité des associations RT / CT / IT optimisées en terme de réponse tumorale.

Les modèles tumoraux syngéniques évalués seront greffés sur les pattes arrières gauches de souris immunocompétentes Balb/c pour le modèle de tumeur colique CT26 ou C57 Black 6 pour le modèle

de tumeur colique MC-38. Les associations seront donc évaluées sur 2 modèles différents avec l'utilisation de 2204 animaux pour la totalité de l'étude).

Pour chaque modèle, la première étape incluant l'analyse de l'expression des cibles d'immunothérapie et l'infiltration de tumeurs par les cellules immunosuppressives après RT +/- CT par 5-FU ou cyclophosphamide (à partir d'échantillons biologiques (sang, tumeurs...) prélevés 7 à 14 jours après traitement sur des souris euthanasiées) nécessitera 324 souris. Pour la seconde partie, 778 souris seront nécessaires pour suivre la progression des volumes des tumeurs pour évaluer l'effet des traitements associés (RT / CT / IT).

Les souris seront réparties par groupes de 5 individus pour la première étape et de 8 individus pour la seconde étape. Ces répartitions prennent en compte la variabilité de chaque modèle et les effectifs choisis permettront d'obtenir des résultats robustes avec une bonne puissance statistique comme nous l'ont démontrées des études précédentes et des données de la littérature (REDUCTION). Les expériences seront toutes réalisées 3 fois afin d'obtenir des résultats fiables. Pour chaque expérience 20 % d'animaux supplémentaires seront greffés afin de constituer des groupes de souris de volumes tumoraux comparables.

Lors de la première partie de l'étude les souris seront mises à mort 7 ou 14 jours après traitement et les prélèvements des tumeurs seront réalisés afin d'évaluer les différents paramètres de la réponse immunitaire anti-tumorale.

Lors de la seconde partie de l'étude, la croissance des tumeurs sera évaluée trois fois par semaine à l'aide d'un pied à coulisse et les souris seront mises à mort lorsque les tumeurs auront atteint 1500mm³ ou lors d'apparition de signes de souffrances. Des études préalables nous ont permis de définir les points limites les plus précoces afin d'éviter toute souffrance des animaux (RAFFINEMENT).

Pour chaque expérience et chaque modèle 27 groupes de souris (associant entre eux 3 groupes de RT différents (contrôle, 3 fractions de 8 Gy et 18 fractions de 2 Gy), 3 groupes de CT différents (placebo, 5-FU, cyclophosphamide) et 3 groupes de IT (Ig control, IT1, IT2), qui seront choisis selon l'expression radio-induite de leur cible) seront évalués.

Etant donné que nous allons évaluer l'effet des modalités d'administration de la radiothérapie sur la réponse immunitaire, il nous est nécessaire de réaliser notre étude sur des modèles animaux. Le REMPLACEMENT des animaux est donc impossible pour cette étude. Les souris seront maintenues dans des cages de 8 individus en présence d'enrichissement. Les irradiations seront réalisées sous anesthésie gazeuse et aucune toxicité n'est attendue aux doses utilisées. Les injections d'IT seront réalisées en vigile en IP 2 fois par semaine durant trois semaines, les injections de CT seront réalisées sous AG en IV une fois par semaine durant trois semaines. Les traitements par IT et CT ont déjà été réalisés dans ces conditions sans entraîner de toxicités particulières. Cependant si des signes de douleur sont observés (animal prostré, tumeur nécrosée douloureuse, perte de poids), les animaux seront mis à mort par dislocation cervicale après anesthésie gazeuse. Afin d'éviter une interférence entre l'utilisation d'antalgiques est la réponse immunitaire évaluée, aucun traitement anti-douleur n'est prévu. Tout signe de souffrance entraînera la mise à mort des animaux.

Les résultats obtenus permettront de fixer un schéma d'administration de RT/IT/CT optimisé sur le fractionnement de la RT et son effet sur la réponse immunitaire.

14381 La rupture d'une plaque d'athérosclérose est l'une des toutes premières causes de mortalité dans les pays développés. Malheureusement, les facteurs qui rendent une plaque plus fragile qu'une autre sont mal connus et il n'est pas possible cliniquement aujourd'hui d'identifier les plaques à risque.

Lors de leur développement, les plaques d'athérosclérose accumulent dans l'intima de la paroi vasculaire, des lipides, des débris de cellules nécrotiques et des cristaux de phosphate de calcium. Le score calcique, qui mesure l'accumulation de calcium dans les artères, est un marqueur de l'avancée de la maladie utilisé couramment. Plus le score calcique est élevé, plus le patient est à risque. Cependant, il semble que les plaques les plus calcifiées soient les plus stables, et que les

patients ayant un score calcique élevé soient des patients à risque car en plus de posséder des plaques lourdement calcifiées, ils possèdent également des plaques peu calcifiées, dont certaines peuvent être très instables.

Aujourd'hui, les plaques à risque sont définies par un remodelage positif, un gros cœur lipidique recouvert d'une fine chape fibreuse, et la présence de microcalcifications. Les premières microcalcifications se forment probablement dès le pré-athérome, et leur fréquence augmente dans les lésions plus avancées. Il a été suggéré que la multiplication de ces microcalcifications provoque la rupture d'une plaque. Nos objectifs sont d'une part, nous allons valider une méthode pharmacologique pour inhiber la formation des microcalcifications chez la souris et d'autre part nous allons déterminer l'impact de l'inhibition des microcalcifications sur le développement des plaques, et notamment sur la présence de cellules inflammatoires et sur leur remodelage.

Dans le squelette et les dents, la minéralisation est initiée par la phosphatase alcaline non spécifique du tissu (TNAP). De nombreuses données font suspecter que la TNAP est également impliquée dans la formation des calcifications vasculaires. Dans les cellules musculaires lisses, nous avons observé que la TNAP est activée par les cytokines inflammatoires TNF-alpha que l'IL-1beta, et que son activation suffit à former des microcalcifications. De plus, les souris qui surexpriment la TNAP dans les cellules musculaires lisses développent des calcifications vasculaires. En absence d'inhibiteur suffisamment spécifique et puissant de la TNAP, il a été jusqu'à aujourd'hui impossible de déterminer l'implication de la TNAP dans le développement des calcifications vasculaires. Dans ce projet, nous allons utiliser un nouvel inhibiteur de TNAP, le SBI-425, développé par un de nos collaborateurs. Cet inhibiteur a permis avec succès de prévenir les calcifications vasculaires dans deux modèles murins les souris qui surexpriment la TNAP dans les cellules musculaires lisses et un modèle murin de pseudoxanthoma elasticum. Dans ces deux modèles, l'inhibition de la TNAP n'a pas montré d'effet toxique, ni d'effet négatif sur l'architecture osseuse.

La première étape consistera à caractériser précisément par microscopie de fluorescence et par micro tomographie par émission de positron (μ TEP) quand les microcalcifications se forment dans le modèle murin d'athérosclérose des souris déficientes en apolipoprotéine E (ApoE^{-/-}). La seconde étape consistera à administrer per os l'inhibiteur SBI-425 3 semaines avant le déclenchement des calcifications pour déterminer son effet sur le développement des microcalcifications mais également sur l'évolution des plaques, avec un regard particulier pour leur inflammation et leur remodelage.

En résumé, nous aurons besoin au maximum pour ce projet qui durera de 3 ans à 5 ans de 230 souris 184 souris ApoE^{-/-}, et de 46 souris sauvages, avec cette répartition

- Caractérisation de l'apparition des microcalcifications 80 souris ApoE^{-/-} et 34 souris sauvages (1ère année du projet)
- Effet du SBI-425 sur les plaques 2 x 26 souris ApoE^{-/-} pour l'imagerie des microcalcifications (2ème année du projet)
- 12 animaux seront utilisés pour vérifier la biodisponibilité du SBI-425 dans le contexte d'un régime hyperlipidique. (2ème année du projet)
- Effet du SBI-425 sur les plaques 26 souris pour l'histologie de l'inflammation (semaine 30) et 26 souris pour l'histologie du remodelage (semaine 45). (3ème année du projet)

Dans cette étude, le principe des 3R est scrupuleusement pris en compte.

Réduire le nombre d'animaux utilisés le nombre d'animaux nécessaire pour chaque tâche a été déterminé statistiquement

Remplacer les modèles animaux par d'autres modèles nous avons effectué *in vitro* la preuve du concept de l'implication de la TNAP dans le déclenchement des microcalcifications en culture de cellules musculaires lisses. Dans les 3 ans de ce projet, nous testerons également en culture l'effet pro-inflammatoire des microcristaux. Cependant, la culture cellulaire est inadéquate pour reproduire la complexité de la plaque d'athérosclérose. La plaque est en effet un tissu hétérogène qui contient notamment un cœur lipidique et une région fibreuse, et héberge plusieurs types cellulaires dont des cellules musculaires lisses à différents stades de trans-différenciation, des macrophages qui

montrent des signes progressifs de cellules spumeuses, et également des débris apoptotiques, nécrotiques et nécroptotiques. La localisation précise des microcalcifications et l'impact de leur inhibition sur l'évolution des plaques ne peuvent donc pas être élucidés à l'aide de cultures ou même à l'aide de co-cultures.

Raffiner, réduire la douleur et le stress des animaux les souris mâles utilisées (les mâles développent des plaques plus grosses que les femelles) seront achetées jeunes et placées en cages de 5 souris à l'âge de 4 semaines. Cette répartition précoce permet de minimiser leur stress et leur agressivité. Ensuite, dans l'ensemble des tâches proposées, aucune chirurgie ni intervention stressante n'est programmée. L'athérosclérose est générée par un régime riche en cholestérol l'inhibiteur de TNAP est administré oralement dans la nourriture.

14382 La santé intestinale est un enjeu majeur en production porcine. Elle peut être affectée par l'exposition à des mycotoxines qui sont des métabolites secondaires toxiques produits par certaines moisissures. En Europe, la majorité des céréales est fréquemment contaminée par le déoxynivalénol (DON).

Les mycotoxines sont très stables depuis la récolte jusqu'aux traitements technologiques de préparation des aliments.

Chez les animaux d'élevage, selon les concentrations, elles entraînent des retards de croissance, une altération de la réponse immunitaire qui peut diminuer la résistance aux maladies infectieuses, entraîner la mortalité et des pertes économiques importantes.

Le porc est très sensible au DON et y est très exposé du fait de son alimentation riche en céréales. Plusieurs études ont montré que le DON peut induire des dysfonctionnements de la barrière intestinale, augmentant par exemple sa sensibilité à des maladies entériques infectieuses, ou moduler la réponse immunitaire, favorisant la réponse inflammatoire. Peu d'études *in vivo* ont abordé les effets du DON à des doses proches de celles de l'aliment recommandé.

Depuis 2007, le prix des matières brutes a fortement augmenté affectant le secteur de la production animale. L'accès à des grains de qualité rendu difficile, oblige à l'utilisation accrue de coproduits pour l'industrie agroalimentaire. Ainsi, même si les rations restent équilibrées sur le plan nutritionnel, les coproduits jouent sur la qualité de l'aliment final. Leur digestibilité varie et ils contiennent des substances indésirables comme les facteurs antinutritionnels. Leur utilisation en alimentation animale représente une opportunité économique et un challenge pour l'efficacité alimentaire.

Cette étude s'inscrit dans le cadre de l'utilisation accrue de coproduits et la gestion du risque mycotoxines.

Une première expérimentation *in vivo* chez le porc comparera deux aliments iso-nutritionnels l'un sans coproduits de soja et l'autre avec coproduits de soja, contaminés ou non par une mycotoxine le DON. Une étude pilote chez le porc a montré que l'aliment coproduits de soja, en raison de la présence de protéines de soja moins digestibles, entraînait une légère diminution du poids des animaux et des effets sur l'histomorphologie de l'intestin. L'hypothèse que nous cherchons à vérifier est que les effets du DON sur les performances zootechniques et la santé intestinale des porcelets sont exacerbés en présence de l'aliment contenant des coproduits de soja.

La deuxième expérimentation vérifiera si, lors de l'utilisation d'un aliment contenant des coproduits de soja, en présence ou non de DON à la dose maximale recommandée pour l'alimentation du porc (0,9 mg DON/kg aliment), un additif commercial composé d'un complexe algue-argile permet de remédier aux effets délétères du DON.

Pour vérifier ces hypothèses, différentes mesures et analyses seront effectuées tout au long des phases expérimentales (pesée, vaccination, prélèvement de sang, d'urine), ainsi qu'au moment de l'euthanasie (prélèvements des organes). Ce qui permettra d'identifier les potentiels effets sur la santé globale de l'animal, de son tube digestif et de son système immunitaire.

Au total, 80 porcelets seront utilisés dans ce projet. Cette expérimentation sera conduite suivant la règle des 3R l'utilisation d'un modèle animal intégré est indispensable pour évaluer la santé intestinale en relation avec l'alimentation. Le nombre d'animaux est réduit au maximum tout en

maintenant une puissance statistique suffisante. Les conditions expérimentales prennent en compte des mesures de raffinement pour le bien-être des animaux (hébergement collectif, tapis en caoutchouc, contacts positifs avec les expérimentateurs, habituation...). Les doses de DON dans l'aliment correspondent à celles fréquemment retrouvées dans les lots commercialisés et n'induisent pas d'effets délétères majeurs chez les animaux. Bien que les doses utilisées ne doivent pas impacter le bien-être animal, si toute fois des signes de souffrances ou de fort stress sont observés, les procédures seront immédiatement arrêtées.

14383 La maîtrise du moment de l'ovulation permet d'optimiser l'insémination des poulinières et représente un intérêt économique important pour les éleveurs. Cependant à l'heure actuelle les éleveurs ne possèdent qu'un faible nombre de molécules capables d'induire l'ovulation. De plus ces molécules ne donnent pas des résultats terrain complètement satisfaisants. Dans ce contexte, la recherche de nouvelles molécules plus performantes représente un intérêt majeur pour la filière équine. Les résultats d'études précédentes montrent que le C6 (analogue de la kisspeptine) serait un bon candidat pour la maîtrise de l'ovulation chez la jument. Nous avons déjà pu montrer que son injection chez la jument permet l'augmentation de la sécrétion d'hormones clé pour le déclenchement de l'ovulation. Avec ce nouveau protocole nous voulons donc tester la capacité de notre molécule à induire l'ovulation chez la jument. Nous utiliserons seize (16) ponettes Welsh qui seront réparties en deux lots de 8 animaux où un groupe sera traité avec du sérum physiologique et un autre sera traité avec du C6.

La réalisation de ce protocole se fera dans le respect des 3R.

Remplacer : Nous cherchons à tester l'effet inducteur de l'ovulation de notre molécule chez la jument, nous souhaitons donc nous placer chez cette espèce pour l'administration de notre molécule.

Réduire Nous avons précédemment réalisé des procédures qui nous ont permis de définir une dose de C6 que nous estimons la plus appropriée pour obtenir un effet sur le taux d'ovulation. Nos précédents protocoles réalisés sur l'espèce équine nous ont permis de voir que des groupes de 8 animaux nous permettaient d'effectuer nos analyses statistiques.

Raffiner Les animaux seront hébergés dans des conditions optimales (paille et foin de qualité, soins quotidiens) sur leur lieu d'élevage et ils seront également répartis en groupe ce qui permet le respect du comportement grégaire de l'espèce équine. La procédure de cathétérisme intra veineux est réalisée sous anesthésie locale et les prélèvements sont effectués par du personnel qualifié et spécifiquement formé.

14384 L'athérosclérose constitue la principale cause des maladies cardiovasculaires. Selon les dernières données de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), ces pathologies représentent l'une des premières causes de mortalité dans les pays industrialisés.

L'action athéroprotectrice des lipoprotéines de haute densité (HDL) est attribuée à leur rôle central dans le transport retour du cholestérol (TRC) qui consiste à ramener le cholestérol des tissus périphériques au foie, seul organe capable de l'éliminer de l'organisme en le sécrétant dans la bile. Les HDL ont également des propriétés protectrices au niveau de la paroi vasculaire. Ces HDL agissent via des récepteurs présents à la surface de cellules hépatiques et endothéliales.

Des études *in vitro* ont montré le rôle clé d'un complexe enzymatique dans la régulation de l'expression membranaire de ces récepteurs et dans la captation de HDL-cholestérol par les cellules hépatiques. Cependant, Ces résultats *in vitro* restent insuffisants.

L'objectif de ce projet est de caractériser le rôle de ce complexe enzymatique dans la régulation du transport retour du cholestérol et son implication dans le développement de l'athérosclérose. Ce projet implique l'utilisation de modèles murins car aucun dispositif *in vitro* ou modèle informatique ne peut reproduire le contexte physiologique et physiopathologique étant donné que le Transport retour de cholestérol comprend plusieurs étapes qui consistent à véhiculer l'excès du cholestérol de la paroi artérielle vers le foie pour être éliminé dans la bile et que le développement de l'athérosclérose met en jeu des interactions et des communications complexes entre différents

tissus et organes. Notre protocole expérimental respecte la règle des 3R : remplacer, réduire et raffiner une attention particulière est portée sur l'optimisation des protocoles afin de limiter le nombre d'animaux au minimum nécessaire pour détecter des effets statistiques significatifs pour chaque groupe dans chaque condition expérimentale. De plus, un même animal pourra être utilisé pour la mesure de plusieurs paramètres, optimisant ainsi la quantité de résultats obtenus par rapport au nombre d'animaux utilisés, tout en respectant des périodes de repos/rétablissement entre les tests. Nous utiliserons des rongeurs provenant d'élevages agréés. Les animaux seront hébergés dans une structure et des conditions parfaitement adaptées (litière changée régulièrement, eau et nourriture, température et hygrométrie régulées.). Les souris seront hébergées en groupe et bénéficieront d'un enrichissement de leur milieu (type papier sopalin, permettant une diminution du stress potentiel et la réalisation de petits nids par les animaux). Tous les animaux feront l'objet d'un suivi quotidien réalisé par les expérimentateurs et le personnel zootechnique pour s'assurer de leur bien-être. La souffrance éventuelle des animaux sera minimisée autant que possible et nous interviendrons immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance. Les différents tests et prélèvements seront réalisés dans des conditions limitant le stress et la douleur des animaux. Le nombre de 945 souris a été défini en accord avec la règle des 3R. Il est réduit au maximum et cependant suffisant pour pouvoir tirer des conclusions soutenues par l'analyse statistique.

Les résultats de ce projet seront soumis à des tests statistiques (test de Student ou ANOVA selon le nombre de groupes comparés).

Les résultats de ce projet constitueront un appui de recherche fondamentale permettant d'évaluer le rôle et l'importance d'une enzyme spécifique dans le métabolisme des HDL et l'athérosclérose. Ces résultats pourraient être à la base d'une nouvelle cible thérapeutique contre l'athérosclérose.

14385 La NASH (stéatohépatite non alcoolique) est une pathologie fréquente dans le monde occidental. Elle se caractérise par une accumulation de graisse dans le foie (stéatose) accompagnée d'inflammation, associée ou non à une fibrose pouvant évoluer en cirrhose et en hépatocarcinome. En effet, les lipides accumulés vont devenir toxiques pour le foie. Cette lipotoxicité va engendrer un stress hépatique. Ces signaux de stress vont ainsi activer les macrophages et recruter et activer les cellules du système immunitaire. Cela mène au gonflement des hépatocytes et à leur mort cellulaire. La composante inflammatoire de la pathologie représente donc un enjeu important dans le développement et l'évolution de la NASH.

Actuellement, aucune molécule n'a reçu d'autorisation de mise sur le marché pour le traitement de la NASH. Beaucoup de molécules sont actuellement en cours de développement. Une première phase de sélection des meilleurs composés a été effectuée sur des modèles acellulaires ou cellulaires, contribuant ainsi à l'utilisation de méthodes alternatives visant à remplacer partiellement l'utilisation des animaux comme nous le rappelle la règle des 3 R's. Dans ce projet, nous allons nous concentrer particulièrement sur des molécules qui ont montré leur efficacité sur la composante inflammatoire de la NASH lors d'études antérieures. Ceci permettra de déterminer et de caractériser leurs actions spécifiques sur l'inflammation. L'étude ex-vivo des propriétés des cellules effectrices de l'immunité et de l'inflammation renseigne plus largement sur les voies de signalisation et mécanismes employés pour lutter contre la pathologie, lors d'études de pharmacologie *in vivo*.

Dans ce projet, nous allons nous centrer spécifiquement sur les propriétés sécrétrices des macrophages après traitement ex-vivo par des molécules cibles.

Les macrophages sont des cellules phagocytaires mononucléées largement répandues dans tout le corps. Ces cellules peuvent contribuer au développement, à l'homéostasie et participer aux réponses immunitaires innées et adaptatives. Les macrophages sont pourvus d'un pouvoir de phagocytose important et, à ce titre, ont longtemps été considérés comme des cellules effectrices immunitaires essentielles par leur capacité à neutraliser les agents infectieux introduits dans l'organisme. Les rôles importants des macrophages dans le maintien de l'homéostasie et dans le remodelage des tissus et la cicatrisation des plaies sont parfois négligés en raison de leur rôle vital dans la défense de l'hôte mais leur contribution à ces mécanismes est également importante. La

physiologie des macrophages peut varier énormément en fonction de l'environnement dans lequel ils résident et des stimuli locaux auxquels ils sont exposés. L'organisme adaptera la réponse des macrophages selon son état physiologique normal ou au contraire pathologique.

A l'état basal, le nombre de macrophages présents dans le péritoine des animaux dans des conditions non stimulées est insuffisant pour des études biochimiques approfondies.

Nous proposons donc dans ce projet d'avoir recours à l'emploi de souris comme organisme producteur de macrophages et d'utiliser un stimulus pro-inflammatoire afin de recruter davantage de cellules macrophagiques nécessaires à la réalisation de nos études.

Le lavage de la cavité péritonéale des animaux ainsi stimulés permet de recueillir un nombre de cellules très conséquent (environ 10^7 cellules), cela autorise la réalisation d'importantes études ex-vivo comparativement au nombre de monocytes (macrophages non différenciés) circulants qui pourraient être issus de la circulation sanguine, ce qui réduit le nombre d'animaux nécessaires aux études envisagées comme nous le rappelle la règle des 3R's. Le nombre d'animaux utilisé est réduit et correspond au seuil minimal qui puisse nous permettre d'obtenir la quantité de cellules désirées.

Les animaux seront sous observation quotidienne et aucun animal en détresse ou en souffrance ne sera maintenu dans cet état, il serait euthanasié par une méthode humaine adaptée le cas échéant. Par ailleurs, l'hébergement des animaux pendant la phase d'acclimatation et pendant l'expérimentation sera faite avec enrichissement du milieu afin d'améliorer leur bien-être.

Pour ce projet nous envisageons d'utiliser 80 souris au cours de la durée de 5 années couverte par l'autorisation.

14386 Les migraines constituent un problème de santé publique ayant un impact négatif majeur dans la vie quotidienne des patients. Les crises de migraine qui concernent 20% des femmes pour 6% d'hommes, sont caractérisées par des céphalées d'intensité modérée ou sévère, unilatérales, pulsatiles, pouvant durer entre 4 et 72 heures en l'absence de traitement. Ces céphalées sont associées à des modifications de la perception sensorielle telles que l'allodynie (douleur provoquée par une stimulation non douloureuse), la phonophobie et/ou la photophobie. Ainsi la physiopathologie de la migraine implique des régions cérébrales multiples pour rendre compte à la fois de la douleur et des troubles sensoriels associés. L'étude des mécanismes physiopathologiques nécessite donc d'avoir recours à l'animal afin de tenir compte de toutes les interactions cérébrales qui entrent en jeu lors d'une crise migraineuse.

Dans ce projet, nous étudierons les mécanismes d'action de la Grande Camomille et de l'écorce de Saule Blanc, qui associées pourraient constituer un traitement de fond des crises de migraine. En effet la Grande Camomille est une plante reconnue traditionnellement pour soulager la migraine, tandis que l'écorce de Saule Blanc a des propriétés anti-inflammatoires. Pour réaliser cette étude, nous utiliserons un modèle murin qui mime la phase de céphalée ou mal de tête de la migraine.

Pour respecter la règle des 3R, le nombre d'animaux utilisés a été réduit au maximum. Dans ce but, les animaux auront une période d'habituation à l'expérimentateur et aux tests avant de débiter l'étude comportementale. Cette période d'habituation permet de réduire le stress des animaux lors des tests comportementaux et ainsi de réduire le nombre d'animaux. Par ailleurs, notre modèle nécessite une chirurgie elle est effectuée sous anesthésie générale (chloral hydrate, 400 mg/kg), les animaux sont placés sur une couverture chauffante pendant le temps de la chirurgie et leur cornée est protégée par une couche de vaseline. Le temps de chirurgie est optimisé au maximum pour qu'il dure le moins longtemps possible. Les animaux sont gardés dans la pièce de chirurgie en observation jusqu'à leur réveil complet. D'après les études précédentes, notre modèle animal n'entraîne pas de dommages tissulaires. Les dommages attendus, mis en évidence précédemment dans notre modèle, sont une douleur céphalique utilisée pour modéliser la crise de migraine. Le nombre d'animaux dans cette étude tient compte des animaux non répondeurs dans notre modèle mais reste suffisant pour détecter un effet significatif entre les traitements (analyse de variance et tests post hoc paramétriques ou non). Au total 128 rats seront nécessaires à la réalisation de ce projet. Ils seront mis à mort à la fin des procédures afin de prélever les tissus d'intérêt pour leur analyse.

Avoir un modèle qui se rapproche le plus possible des conditions cliniques pour comprendre les mécanismes moléculaires impliqués permettra par la suite de déterminer les substances et doses pharmacologiques susceptibles d'être une alternative aux traitements proposés aux patients migraineux.

14387 L'insuffisance cardiaque (IC) correspond à l'incapacité du cœur à assurer un débit cardiaque suffisant pour couvrir les besoins énergétiques de l'organisme y compris les muscles périphériques incluant les muscles respiratoires tel que le diaphragme. Du point de vue clinique, les patients qui ont une IC présentent une faiblesse musculaire périphérique et respiratoire. Cela engendre une intolérance à l'exercice et engage le pronostic vital de ces patients. Des études antérieures chez l'animal montrent une réduction de la fonction contractile du diaphragme avec une altération de la structure des fibres musculaires diaphragmatique.

Dans le muscle squelettique, la contraction musculaire se fait suite à un phénomène qui s'appelle le couplage excitation-contraction. Il se traduit par une libération massive du calcium dans la cellule musculaire à travers une protéine canal qui s'appelle récepteur de la ryanodine. Cette protéine est un complexe macromoléculaire qui fonctionne mal dans de nombreuses pathologies musculaires. Cela engendre une perturbation de l'homéostasie calcique et induit une dysfonction contractile musculaire qui s'observe notamment au cours du vieillissement, de la myopathie du Duchenne, de la dysfonction diaphragmatique induite par la ventilation mécanique. Cependant l'implication de cette protéine dans la dysfonction diaphragmatique au cours de l'insuffisance cardiaque ainsi que les mécanismes subcellulaires ne sont pas connues. Pour mieux comprendre ces mécanismes, nous allons induire un infarctus du myocarde chez des souris et nous allons étudier ses effets sur la fonction respiratoire au niveau cellulaire, moléculaire et fonctionnel.

Nous respectons la règle des 3R pour cette étude :

Remplacement : Nous avons précédemment utiliser des méthodes alternatives pour la découverte et la validation de cibles thérapeutiques (screening moléculaire et pharmacologique *in vitro* et *in silico*), ce qui nous à permis de limiter notre champs d'investigation à une cible thérapeutique.

L'étiologie humaines de l'insuffisance cardiaque post infarctus est reproduite chez l'animal par une intervention chirurgicale. Malgré le caractère délétère, cette intervention est nécessaire pour reproduire dans un système intégré, l'animal, les différentes composantes de la pathologie humaine. Ceci est un gage d'une meilleure transposition vers la clinique dont le besoin de nouveaux traitements est urgent. Malheureusement, il n'existe actuellement aucune méthode (*in vitro* ou *in silico*) permettant de suivre l'évolution de l'insuffisance cardiaque.

Lors de cette étude et dans un souci de réduction, chaque animal est utilisé pour mesurer plusieurs caractéristiques (physiologiques, histologiques, biochimiques et moléculaires) du développement de la pathologie. Un maximum d'approches peu invasives et indolores (électrocardiogramme, échocardiographie) seront utilisées.

Compte tenu de la variabilité de ces mesures, le nombre total d'animaux utilisés dans ce projet sera estimé à 80 qui vont être réparties sur 4 groupes control (ou SHAM), insuffisant cardiaque, insuffisant cardiaque+ traitement 1 et insuffisant cardiaque+ traitement 2. Ces deux traitements sont des molécules en développement qui visent à améliorer le fonctionnement du récepteur de la ryanodine.

Raffinement : L'intervention chirurgicale, qui vise à reproduire chez l'animal l'infarctus du myocarde tel qu'il est observé en clinique, est réalisée sous anesthésie et analgésie pré, per et post opératoire. Pour améliorer le quotidien des souris, des matériaux de litière ou des structures de repos adaptés sont installés dans les cages (mouchoir en papier, rouleau en carton...).

14388 Les maladies cardiovasculaires représentent la première cause de mortalité et constituent donc un enjeu majeur de santé publique. En France, entre 500'000 et 1 million de personnes souffrent d'insuffisance cardiaque, pour un coût estimé à 1 milliard d'euro. Afin d'améliorer le traitement de ces maladies et la prise en charge des patients, nous devons à l'heure actuelle proposer de nouvelles cibles thérapeutiques. A cette fin, une meilleure compréhension des mécanismes

moléculaires impliqués est nécessaire. Dans ce contexte, l'utilisation du modèle murin est indispensable pour faire progresser nos connaissances, et de nombreuses études ont montré que le modèle d'ischémie-reperfusion cardiaque (I/R) chez la souris (mus musculus C57BL/6J) induit un remodelage myocardique et implique des mécanismes moléculaires semblables à ceux observés chez le patient souffrant d'infarctus du myocarde, l'une des causes majeures de l'insuffisance cardiaque chez l'homme. L'infarctus du myocarde est déclenché par une procédure chirurgicale, ce qui nous permet ici d'étudier les changements structurels (hypertrophie, fibrose), métaboliques (peroxydation lipidique, stress oxydant, oxydation du glucose) et fonctionnels (fraction d'éjection cardiaque et de raccourcissement du ventricule gauche). Ces processus sont complexes, dynamiques, tributaires du temps et après une période d'adaptation, aboutissent finalement à une insuffisance cardiaque chronique. Le processus de ce remodelage cardiaque débute dans la semaine qui suit l'infarctus du myocarde et modifie l'organisation et les propriétés du cœur. L'importance du remodelage ventriculaire est un facteur prédictif de mortalité après l'infarctus du myocarde et certains médicaments visent à limiter ce remodelage. Cette approche nous permet ainsi d'étudier l'influence d'une molécule sur la progression de l'infarctus et des dégâts associés au niveau du cœur. Les expériences sont élaborées en adéquation à la "règle des 3 R" (W.M.S. Russell et R.L. Burch) : réduire (le nombre d'animaux utilisés; 334 animaux demandés dans le cadre de ce protocole); raffiner (en évitant les doublons expérimentaux, en appliquant des mesures strictes afin de réduire la douleur pendant les procédures expérimentales -anesthésie, tapis chauffant, monitoring global de l'animal); remplacer (en s'efforçant de remplacer le modèle animal par des techniques *in vitro*). De plus, tout au long de l'expérimentation, les animaux sont hébergés dans notre zootechnie agréée et sous surveillance quotidienne (jours-fériés et weekend compris) d'un personnel qualifié. De plus, ils bénéficient d'un suivi régulier par notre responsable bien-être animal. Nous définissons également des points limites précis concernant l'état de souffrance des animaux, et tout franchissement de ces points limites entraînera le sacrifice immédiat de l'animal. Dans son ensemble, ce projet nous permettra de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la progression de l'infarctus du myocarde et ainsi de proposer de nouvelles cibles thérapeutiques innovantes afin d'améliorer le traitement et la prise en charge des patients.

14389 Les tumeurs cérébrales appelées glioblastome étant de très mauvais pronostic, des recherches très intenses sont indispensables pour améliorer leur prise en charge thérapeutique. La croissance et la réponse aux traitements de ces tumeurs mettent en jeu des mécanismes de communication très complexes, bi-directionnels, entre les cellules tumorales elles-mêmes et leur microenvironnement cérébral. Cette complexité ne peut pas être modélisée à l'aide de cultures cellulaires *in vitro* et la mise en œuvre de modèles *in vivo*, tels que les modèles de greffes intracérébrales de tumeurs humaines chez la souris, sont nécessaires pour valider au niveau préclinique les stratégies thérapeutiques envisagées (Remplacement). La difficulté posée par l'utilisation des modèles de tumeurs intracérébrales *in vivo* reste le suivi de la croissance tumorale au cours du temps.

L'objectif du projet est de développer, à partir de cellules de glioblastome exprimant la luciférase (lignée U87-luc2) et capable d'émettre un signal bioluminescent, un modèle de tumeur greffée en intracérébral chez la souris, et de caractériser la croissance tumorale grâce à une technique d'imagerie non invasive et quantitative, la bioluminescence (BLI), dont le signal sera détecté et mesuré à l'aide d'un système original nommé OptiMAX®. Les techniques d'imagerie non-invasives permettent de réduire le nombre d'animaux utilisés en expérimentation puisqu'elles permettent de réaliser des suivis dans le temps sur un même animal (Réduction). Pour valider le modèle d'une part, et les mesures de BLI d'autre part, nous serons amenés à (i) comparer la croissance de tumeurs U87-luc2 à celle de cellules U87 conventionnelles, et ce, après greffe sous-cutanée ou après implantation intracérébrale (ii) confronter les résultats d'imagerie BLI obtenus avec le système Optimax aux approches standard (c'est-à-dire pour les tumeurs sous-cutanées, les mesures au pied à coulisse pour les tumeurs intracérébrales, l'imagerie IRM) classiquement utilisées pour la détermination des volumes tumoraux.

Ainsi, au maximum 62 souris immunodéficientes recevront une greffe sous-cutanée ou intracérébrale de cellules cancéreuses U87-luc2 ou U87 selon des protocoles maîtrisés par le

laboratoire. Le développement des tumeurs implantées sera suivi au cours du temps par pied à coulisse pour toutes les tumeurs sous-cutanée, par IRM pour toutes les tumeurs intracrânielles et en parallèle, par BLI pour toutes les tumeurs U87-luc2. Tout au long de l'étude qui n'excèdera pas 10 semaines, le bien-être des animaux fera l'objet d'un suivi quotidien, les souris seront anesthésiées dès lors que des procédures stressantes et/ou douloureuses seront réalisées (implantation de tumeur, imagerie, etc), et mises à mort dès lors que l'un des points limites sera atteint (Raffinement).

14390 La neurotoxicité iatrogène est un réel problème en pratique clinique. Par exemple, certains anticancéreux neurotoxiques sont responsables de neuropathies périphériques chimio-induites (CIPN) correspondant à des lésions des nerfs périphériques. Ces CIPN sont très difficiles à traiter et peuvent perdurer longtemps après la fin des traitements et devenir de véritables séquelles des traitements pour les patients.

Ainsi, la détection précoce de cette neurotoxicité (neuropathie périphérique) lors du développement des médicaments est un enjeu stratégique pour l'industrie pharmaceutique et cela pour éviter de mettre sur le marché des médicaments responsables d'effets indésirables neurologiques. Cependant à ce jour, cette neurotoxicité est très difficile à mettre en évidence chez l'animal et surtout aucun biomarqueur précoce n'est clairement validé pour anticiper l'apparition d'une neuropathie périphérique chez l'animal et au final chez l'homme.

L'objectif de ces travaux consistera à étudier des biomarqueurs de neuropathie périphérique sur un modèle animal de CIPN induite par l'oxaliplatine. L'oxaliplatine est un médicament anticancéreux utilisé contre le cancer colorectal et pourvoyeur de CIPN très invalidante pour les patients. Parmi les agents anticancéreux neurotoxiques, l'oxaliplatine a été choisi car c'est un anticancéreux de première intention dans la prise en charge des cancers colorectaux (3ème cancer par ordre de prévalence) et celui-ci présente une forte neurotoxicité (40% des patients traités développent des CIPN).

Pour ce projet 240 rats mâles Wistar Han seront nécessaires.

Le nombre d'animaux a été choisi pour un nombre maximal de n=12 rats par groupe de traitement (4 groupes de traitement contrôle, oxaliplatine 1 mg/kg, 2 mg/kg et 4 mg/kg) avec la répétition de 5 modèles animaux pour couvrir un panel de tests comportementaux.

Pour l'ensemble des expérimentations envisagées, la règle des 3R sera appliquée afin de limiter le nombre d'animaux utilisés (nombre maximal d'animaux utilisés n=12 par groupe et possibilité de réduire le nombre lors d'analyse intermédiaire), d'avoir recours à des tests validés dans la littérature scientifique et de limiter la souffrance animale (même si l'objet de ces travaux est la neuropathie périphérique souvent associée à de la douleur neuropathique, les choix des doses d'anticancéreux ont été validés dans la littérature scientifique afin d'avoir des animaux dans un bon état général, indispensable pour la qualité et l'exploitabilité des résultats).

Le recours à l'animal demeure indispensable pour reproduire la complexité des symptômes présentés par les patients en clinique, c'est-à-dire l'administration intraveineuse d'un agent anticancéreux, un métabolisme et une symptomatologie clinique avec des anomalies comportementales non accessibles par des tests *in vitro*, *ex vivo* ou *in silico*. L'étude du comportement nécessite l'emploi d'animaux vigiles.

Les animaux seront suivis quotidiennement (week-end compris) afin de détecter tout comportement douloureux anormal. Le développement des modèles de CIPN impose des injections régulières (à minima 2 fois par semaines) avec une pesée des animaux permettant un suivi rapproché de l'animal (pelage, souillure et contrôle des points limites). De plus, le lendemain de chaque injection, un contrôle de l'état des animaux sera réalisé. Ce suivi est réalisé classiquement avec ce type de modèle animal. Comme l'objectif de l'étude est l'évaluation des troubles neuropathiques, il ne sera pas envisageable de prendre en charge les douleurs par un traitement antalgique conventionnel. Néanmoins l'environnement des animaux sera enrichi par l'ajout de jeux dans la cage des animaux. Si un animal manifeste des troubles comportementaux en lien avec une douleur excessive (prostration, vocalisation, isolement dans la cage, pelage souillé, hérissé du poil), il sera alors

euthanasié par inhalation de CO₂. Ces modèles sont suffisamment évolués (raffinement du choix des doses d'anticancéreux), de telle sorte que ce genre de comportement ne se rencontre que très rarement. Aussi, les tests comportementaux permettant d'évaluer les troubles neuropathiques chez les animaux nécessitent d'avoir des animaux dans un bon état général.

Les animaux seront stabulés dans des conditions standards d'au maximum 4 animaux par cage, dans une salle climatisée et auront un libre accès à la boisson et à la nourriture tout au long des expérimentations.

A l'issue du projet les animaux seront euthanasiés pour réaliser des prélèvements tissulaires souhaités pour l'étude (notamment tissus neveux) et de sang pour des analyses ultérieures et dans l'objectif d'exploiter au maximum les modèles animaux réalisés.

14391 La compréhension des mécanismes associés au fonctionnement de la reproduction et le test de nouvelles molécules pouvant faire varier ceux-ci passe obligatoirement par le dosage des gonadotropines, luteinizing hormone (LH) et follicle stimulating hormone (FSH), hormones clés dans l'axe reproducteur. Chez le cheval, nous ne disposons actuellement que d'une méthode de dosage radio-immunologique (Radio Immuno Assay, RIA). L'utilisation de la radioactivité présente un risque d'exposition des utilisateurs lors de dosages répétés, mais aussi implique des équipements coûteux, et génère des déchets radioactifs. Nous souhaitons développer une méthodologie alternative basée sur l'utilisation d'anticorps et d'une détection basée sur une réaction enzymatique (Enzyme Immuno Assay, EIA). Afin de mettre au point et valider cette méthode de dosage, nous devons disposer d'un stock d'échantillons de plasma sanguin de juments cycliques. Ainsi ce protocole vise à collecter environ 200 mL par des prises de sang sur différents individus pour obtenir environ 100mL de plasma sanguin qui nous permettront de constituer un stock de plasma prenant en compte les variations individuelles, cela nous servira à la mise au point finale du dosage de LH équine. Le protocole proposé s'inscrit dans la règle des 3R

Remplacer : le développement d'un dosage hormonal implique d'avoir des échantillons biologiques disponibles pour faire cette mise au point. Nous avons déjà utilisé le surplus de précédents échantillons collectés dans un premier temps pour développer les premiers éléments sur la faisabilité de ce dosage. Nos résultats sont aujourd'hui encourageants mais nous cherchons à améliorer le seuil de détection et la sensibilité, ce qui nécessite de nouveaux échantillons.

Réduire : Pour tenir compte des variations interindividuelles, nous étudierons le plasma de 16 individus. Nous prélèverons aussi uniquement l'équivalent en sang d'un tube de prélèvement de 10mL.

Raffiner : Les animaux que nous utiliserons seront prélevés sur leur lieu de vie par un personnel formé à la réalisation de cette procédure. Ils resteront avec leur congénère pendant le prélèvement.

14392 Les nanomatériaux (composés de particules < 100nm) sont de plus en plus présents dans le secteur de l'agro-alimentaire, notamment dans les aliments en tant qu'additifs E171 (colorant, TiO₂), E551 (antiagglomérant, SiO₂) ou complément nutritif (ZnO). Ces additifs contiennent un pourcentage variable de nanoparticules (NPs) qui sont, du fait de leur petite taille, susceptibles d'avoir des effets toxiques spécifiques sur l'organisme. L'exposition à ces additifs est souvent chronique (jusqu'à 1-10 mg/kg/jour en Europe) et commence très tôt, via la consommation maternelle suivie d'un passage vers le fœtus (transplacentaire) ou dans le lait. Le microbiote intestinal se retrouve donc au contact de ces additifs dès son implantation à la naissance.

Au vu de l'activité antibactérienne de certains additifs comme le TiO₂ et le SiO₂, une exposition maternelle pourrait conduire à un déséquilibre du microbiote (dysbiose) chez la descendance. Le microbiote joue un rôle majeur dans la protection de l'intestin face aux antigènes alimentaires et un déséquilibre peut donc favoriser le développement de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), ou de cancers le long du tube digestif. Le but est donc d'étudier les effets d'une exposition chronique à trois additifs (TiO₂, SiO₂, ZnO), de la vie in utero jusqu'à l'âge adulte, sur l'axe microbiote-intestin.

Pour ce projet, des souris seront exposées durant la gestation et la lactation à des doses d'additifs, ou de leur nanomatériau de référence (100% de NPs), encadrant l'exposition humaine. Les additifs seront incorporés dans les aliments ou l'eau de boisson. La dysbiose de la mère et des nouveau-nés, ainsi que la répartition des particules dans l'organisme fœtal seront étudiées par microscopie et dosage. Au sevrage, certains petits seront ensuite exposés aux additifs, couplés ou non avec un régime gras, représentatif des pays occidentaux. A l'âge adulte, la dysbiose et la répartition des particules seront de nouveau étudiées, ainsi que l'inflammation intestinale et les pathologies associées, par histologie, microscopie, dosage et tests de perméabilité intestinale.

Ce projet sera conduit dans le respect de la règle des 3R et nécessitera 5712 souris, les modèles alternatifs ne permettant ni d'étudier la répartition des particules dans l'organisme ni de recréer la complexité des dialogues intestin-microbiote, ni de voir les impacts sur un organisme exposé dès la périnatalité. Ces souris seront réparties sur 5 mois (gestation incluse) pour avoir une étude aux différents stades de développement, pour trois additifs. Une étude préliminaire sur le placenta humain a permis d'obtenir des résultats de passage pour un additif, justifiant ainsi d'étudier l'exposition périnatale chez la souris. Le nombre de souris a été ajusté afin d'avoir le minimum requis par les tests statistiques et pouvoir exploiter les résultats. Tout sera mis en œuvre pour assurer le bien-être des animaux avec notamment un hébergement collectif dans des cages enrichies avec des dispositifs de nidification pour réduire le stress et l'utilisation de l'anesthésie pour les procédures potentiellement douloureuses. Si malgré toutes les mesures prises pour réduire le stress au minimum, une souffrance est constatée, la procédure sera systématiquement arrêtée.

14393 Rationnel- L'obésité est associée à une inflammation chronique à bas bruit initiée au sein du tissu adipeux blanc par l'infiltration de différentes cellules immunes, principalement les macrophages, dont l'accumulation est considérée comme un élément déclenchant du développement de l'insulino-résistance et du diabète de type 2. Des modifications du microbiote intestinal (ou dysbioses) ayant été observés chez les sujets obèses, l'utilisation de probiotiques (microorganismes ayant des effets bénéfiques sur la santé), de bactéries commensales isolées du microbiote humain ou de prébiotiques (fibres alimentaires favorisant la croissance des probiotiques au niveau intestinal) capables de moduler/restaurer l'équilibre du microbiote, mais également de diminuer l'inflammation associée, a été proposée comme une stratégie de contrôle des troubles métaboliques, en particulier ceux associés à l'obésité. Nous avons pu mettre en évidence les capacités anti-obésité de certaines souches probiotiques sur le développement de l'obésité et de l'inflammation qui lui est associée, chez la souris. Nos travaux antérieurs indiquent clairement que les capacités protectrices des probiotiques sont souche-spécifiques.

Objectifs-Nous souhaitons poursuivre cette étude en évaluant l'effet d'autres souches potentiellement probiotiques et également l'effet de bactéries commensales isolées du microbiote humain, dont la présence est diminuée chez les sujets obèses, de prébiotiques et éventuellement d'association pré et probiotiques (symbiotique). Seules les souches ayant préalablement été démontrées *in vitro* comme possédant des propriétés fonctionnelles intéressantes (profils anti-inflammatoires, capacité à restaurer la barrière épithéliale et à induire des peptides entéro-endocrines) seront testés dans nos modèles d'obésité ('Réduction'). Par ailleurs, notre étude vise à élucider les mécanismes d'action des probiotiques/prébiotiques dans le développement de l'obésité et de l'insulino-résistance processus physiopathologiques mettant en jeu de nombreux tissus et organes ainsi que divers types cellulaires. Ceci impose donc le choix d'approches expérimentales *in vivo* et *ex vivo* chez la souris ('Remplacement').

Modèles Animaux et Méthodologie -Nous testerons l'effet de différentes souches, mélanges de souches, de prébiotiques ou de symbiotiques (Procédure N°1) dans différents modèles de souris obèses et/ou diabétiques reconnus comme étant les modèles de référence dans le domaine.

Dans un premier temps nous mettrons en place un modèle court de pré-diabète (régime hyperlipidique enrichi en sucre, procédure N° 2) afin d'évaluer l'impact des souches ou ingrédients sur l'expression de gènes d'inflammation ou de gènes impliqués dans la régulation des métabolismes glucidique ou lipidique, après 7 jours (Raffinement) de traitement (études préliminaires effectuées en collaboration avec l'équipe d'Hubert Vidal, Lyon). Des souris mâles

C57BL/6 seront supplémentées pendant 5 jours par voie intra-gastrique (permettant une meilleure délivrance sur une courte période), puis soumises au régime, les souris continuant à recevoir le traitement et l'expérience sera arrêtée après 7 jours de régime. Chaque expérience sera réalisée sur un nombre maximal de 6 souris par groupe et comprendra un maximum de 6 groupes soit 36 souris maximum par expérience, 6 expériences sur 18 mois, soit un total de 216 souris.

Les souches présentant les effets les plus pertinents (« Réduction ») seront ensuite évaluées dans un modèle long d'obésité (procédure N° 3), soit par administration préventive (en même temps que le démarrage du régime) soit thérapeutique (chez des souris déjà rendues obèses après 6 semaines de régime). Des souris sauvages mâles C57BL/6 soumises à un régime hyperlipidique (régimes commercialisés sous forme de croquettes irradiées, à 45% ou potentiellement 60%° de calories provenant des lipides) constitueront notre modèle d'obésité d'origine alimentaire, plus proche de celle observée chez l'Homme. Les souris recevront quotidiennement (5 jours par semaine) les pré ou probiotiques ou bactéries commensales tout au long de l'expérience par voie orale (intra-buccale afin d'éviter un stress trop important sur une longue durée). Chaque expérience sera réalisée sur un nombre maximal de 12 souris par groupe et comprendra un maximum de 6 groupes soit 72 souris maximum par expérience, 144 souris par an (2 expériences/an) soit un total de 432 souris sur 3 ans. Dans ces modèles l'insulinorésistance s'observe classiquement à partir de la 12^{ème} semaine de mise sous régime les expériences seront donc arrêtées à la 16^{ème} semaine ('Raffinement').

Total du nombre de souris modèle court + modèles longs 216 + 432 = 648 souris

Les critères expérimentaux suivis seront les suivants 1) prise de poids corporel et prise alimentaire (relevés hebdomadaires), 2) inflammation locale (au sein du tissu adipeux blanc) et systémique (prélèvements de sang en fin d'expérience (procédure N°4) ainsi que récupération de divers tissus et organes lors du sacrifice), 3) métabolisme glucidique et lipidique (tests de tolérance au glucose ou de sensibilité à l'insuline *in vivo* en cours d'expérience (procédure 5))

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

14394 Le syndrome d'apnée obstructive du sommeil (SAOS) est le trouble respiratoire nocturne le plus fréquent dans la population. Il se caractérise notamment par une hypoxie intermittente (HI), responsables des complications cardiovasculaires telles qu'hypertension artérielle, maladie coronarienne, insuffisance cardiaque ou accident vasculaire cérébrale, mais aussi métaboliques, telles que insulino-résistance et diabète de type 2. Il a été précédemment montré que l'HI induit un remodelage structural et fonctionnel du tissu adipeux viscéral (inflammation, insulino-résistance tissulaire) qui contribue aux dysfonctions métaboliques du patient apnéique, que ce soit chez des individus minces ou obèses. L'objectif de ce présent projet est d'évaluer de façon plus précises les mécanismes impliqués dans l'inflammation du tissu adipeux et l'insulino-résistance induites par l'HI. Ainsi, nous ciblerons plus précisément la voie de signalisation TLR4, en accord avec des résultats récents obtenus sur culture cellulaire. Deux séries d'animaux seront réalisées. Dans la première série, nous utiliserons un modèle de souris avec délétion du gène codant pour TLR4, dans la seconde série, nous traiterons les animaux par un inhibiteur pharmacologique de TLR4. Tous les animaux (nombre total de 80 souris) seront ensuite exposés à l'HI ou à la condition contrôle normoxique. Les procédures expérimentales utilisées pour ce projet n'apporteront aucune souffrance à l'animal.

Réduire : le nombre maximal d'animaux nécessaires a été calculé au plus juste afin d'obtenir des données statistiquement analysables.

Remplacer : il n'est pas possible de remplacer l'utilisation des animaux car nous effectuons une étude systémique et souhaitons observer des effets sur l'ensemble du corps de la souris.

Raffiner : les souris seront hébergées dans un environnement contrôlé, enrichi, avec un accès continu à la nourriture et à l'eau. Elles seront observées quotidiennement afin de s'assurer de leur bien-être. Une grille de point limite est établie d'agir sur les animaux avant qu'ils ne souffrent.

14395 Les traitements de radiothérapie par photons ou protons sont utilisés dans plus de la moitié des traitements contre le cancer.

Contrairement à la radiothérapie standard par photon, la protonthérapie permet de délivrer la dose prescrite dans la tumeur, tout en préservant les organes avoisinants. Les organes de proximité ne sont donc pas irradiés et le risque de complications est largement réduit.

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'effet de deux schémas de fractionnement de la protonthérapie (nombre de séances de rayons délivrées avec des protons) associée à une immunothérapie sur la progression des tumeurs sous-cutanées pour analyser l'efficacité du traitement, en utilisant des cellules murines de colon de souris immunocompétentes.

Pour chaque expérience et chaque modèle, 6 groupes de souris composés d'un groupe contrôle et de 5 groupes de traitements avec les deux fractionnements et/ou l'immunothérapie seront évalués. Les souris seront réparties par groupes de 15 individus.

Cette étude vise à démontrer que la modulation de la dose par séance et du nombre de séances, peuvent induire des effets différents avec des équivalences de doses totales biologiques combinées ou non à de l'immunothérapie.

Au total, 216 souris immunocompétentes Balb/c seront nécessaires pour obtenir des résultats fiables tout en respectant la démarche des 3Rs

Remplacement Des études préliminaires réalisées *in vivo* ont permis de mettre en évidence l'importance du système immunitaire dans la capacité de la radiothérapie à impacter sur la réponse immunitaire antitumorale et sur l'induction de la mort immunogène. A ce stade de nos connaissances, l'étude de l'activation de la réponse immunitaire antitumorale nécessite obligatoirement l'utilisation de modèles animaux.

Réduction Les effectifs sont justifiés par l'importante variabilité des résultats obtenus sur l'étude du système immunitaire dans l'efficacité du traitement pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. Le nombre de paramètres mesurés par animal a été optimisé et nous avons privilégié les études longitudinales.

Raffinement Toute manipulation susceptible de générer de l'inconfort ou de la douleur (irradiation) sera réalisée sous anesthésie. Les souris seront observées tous les jours et la croissance des tumeurs sera mesurée trois fois par semaine. Les données seront intégrées à l'aide d'une grille d'évaluation (état de stress, niveau de douleur, taille de tumeur, etc) et l'animal sera pris en charge selon le score obtenu (traitement contre la douleur si nécessaire), avec arrêt de l'expérience dès qu'un point limite sera atteint. Des études préalables nous ont permis de définir les points limites les plus précoces afin d'éviter toute souffrance des animaux.

Les procédures expérimentales du projet seront réalisées par des personnes habilitées et formées. Les animaux seront hébergés selon les normes en vigueur avec des conditions d'hébergement et d'enrichissement de leur environnement (abri afin que les souris puissent se cacher, élément à ronger et matériel de nidation) conformes à la validation de la cellule bien-être.

Les résultats obtenus permettront de fixer un schéma d'administration de radiothérapie propice à l'association avec des immunothérapies qui sont actuellement évaluées dans de nombreux essais cliniques et dont les effets sont prometteurs

14396 L'équilibre du système immunitaire est primordial pour lutter contre les infections et les tumeurs, tout en limitant les désordres inflammatoires. Ces dernières années, l'émergence de l'immunothérapie (stimulation du système immunitaire contre les cellules cancéreuses) a permis de développer une autre approche thérapeutique moins « pénible » pour les patients que les traitements classiques comme la radiothérapie ou la chimiothérapie. L'immunothérapie a montré des effets bénéfiques dans plusieurs formes de cancers. À l'inverse, une dérégulation du système

immunitaire peut conduire à l'apparition de maladies inflammatoires chroniques comme les maladies autoimmunes, représentant un problème majeur de santé publique dont les approches thérapeutiques actuelles ne donnent pas entière satisfaction. Nous savons que les cellules T jouent un rôle majeur dans la réponse immunitaire anti-tumorale, mais revers de la médaille, ils sont souvent des acteurs des dysfonctionnements pathologiques. Une stratégie thérapeutique ciblant ces cellules pourrait conduire à effet bénéfique comme à un effet nocif. Il est donc important d'améliorer nos connaissances sur les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu dans les réponses immunitaires afin de développer les stratégies thérapeutiques les mieux adaptées. Dans ce contexte, la manipulation de la signalisation des cellules T représente une cible potentielle pour des traitements anti-cancéreux et pour des traitements contre les maladies autoimmunes. L'objectif de ce projet est de savoir si une thérapeutique modulant l'activité des cellules T en périphérie, favoriserait le développement d'une réponse immunitaire anti-tumorale efficace, et quelle serait également l'impact de cette modulation sur une maladie autoimmune. Pour cela, nous utiliserons 2 modèles expérimentaux chez la souris un modèle de mélanome sous-cutané comme cancer et un modèle de sclérose en plaques comme autoimmunité.

Pour l'ensemble du projet, il est prévu d'utiliser un maximum de 360 animaux sur 5 ans. La règle des 3R sera appliquée dans le cadre de ce projet.

1-Remplacement le recours à l'expérimentation animale dans le cadre de cette étude se fait après de nombreuses études *in vitro* dans des modèles cellulaires. Le principe de remplacement n'est pas applicable à ce projet car les études *in vitro* ne reproduiraient pas l'ensemble des voies impliquées dans des modèles physiologiques intégrés et par conséquent ne permettent pas l'obtention de résultats scientifiques exploitables et pertinents de la pathologie humaine.

2-Réduction le modèle murin utilisé, nous permettra d'optimiser l'utilisation des animaux en combinant le suivi clinique et l'analyse fonctionnelle *in vitro*, sur un même animal. Ce design de l'étude permet de réduire le nombre à 10 souris par groupe afin d'acquérir des données fiables.

3-Raffinement Les conditions d'expérimentations font l'objet d'une procédure de suivi du bien-être animal. Afin de suivre la directive européenne 2010/63/UE, un enrichissement sera rajouté aux animaux sous la forme de carrés de coton pur ou de papier absorbant permettant aux animaux de faire une nidation. Les animaux seront suivis quotidiennement à l'initiation du modèle. Ils seront tous sacrifiés entre le 15ème et 20ème jour du début de l'expérimentation sauf si un animal présente un des points limites d'arrêt de la procédure, que nous aurons définis pour limiter la douleur, la souffrance ou l'angoisse de l'animal

- aspect général de l'animal (perte de poids supérieure à 20% du poids initial, posture voutée ou prostrée, vocalisation, tremblement, agressivité, anomalie de la respiration, hypo ou hyperthermie)

- aspect et taille de la tumeur (taille supérieure à 1 cm³, activité de grattage ou de léchage anormale, plaie)

- signes cutanés (nécrose, écoulement). Dans ces cas, tous les animaux seront euthanasiés avant le terme de la procédure. De plus, les personnes responsables du projet ont été formées à l'utilisation des animaux à des fins scientifiques elles garantissent la formation et de l'encadrement des autres expérimentateurs impliqués dans les procédures expérimentales. L'apprentissage et la maîtrise des gestes techniques sont reportés dans les livrets de compétences des personnes concernées.

14397 À l'heure actuelle, la médecine obstétricale moderne est axée sur la réduction des complications lors de l'accouchement. En conséquence, les césariennes sont l'une des chirurgies les plus courantes au monde, représentant environ 20% des naissances en France. Bien que cette procédure médicale ait sauvé la vie de femmes et d'enfants, elle peut également avoir des effets délétères, notamment un risque plus élevé de développer des maladies chroniques plus tard.

Le microbiote intestinal est une communauté dynamique influencée par de multiples facteurs tout au long de la vie d'un individu. La transmission du microbiote par la mère est le facteur le plus important qui conditionne le schéma de colonisation microbienne chez le nouveau-né (primocolonisation). L'accouchement par césarienne, en supprimant cette transmission du

microbiote de la mère, induit des perturbations majeures au niveau de la primocolonisation. Au cours du développement précoce du nouveau-né, des perturbations dans les interactions entre le microbiote et l'hôte pourraient nuire de manière irréversible et durable à la maturation du système immunitaire, prédisposant l'hôte à développer des maladies inflammatoires et une altération de la fonction de la barrière intestinale. Par ailleurs, la césarienne est associée à certains troubles neuropsychiatriques tels que le trouble bipolaire, les troubles du spectre autistique et le trouble d'hyperactivité avec déficit de l'attention. Notre hypothèse est que la perturbation des schémas de colonisation précoce pourrait entraîner des modifications du câblage de l'axe intestin-cerveau et entraîner des troubles neuropsychiatriques.

Bien que des méthodes d'ensemencement de bactéries visant à inverser les effets de la césarienne aient été suggérées, leur mise en oeuvre est délicate d'un point de vue sécurité sanitaire. Des interventions nutritionnelles (c'est-à-dire des modifications de régime alimentaire) ciblées au tout début de la vie pourraient constituer des stratégies plus faciles à mettre en oeuvre et à contrôler pour compenser les perturbations du microbiote dues à la césarienne. Le DHA est un oméga-3 essentiel à la croissance et au développement fonctionnel du cerveau chez les nourrissons. Des taux déséquilibrés d'acides gras essentiels sont observés chez les patients atteints de troubles du développement neurologique. Les acides gras polyinsaturés oméga-3 sont connus pour avoir un impact sur le cerveau et le microbiote. Par conséquent, le DHA est un bon candidat à utiliser dans une intervention nutritionnelle pour contrebalancer les effets de la césarienne.

Dans ce projet, nous nous proposons d'étudier l'influence d'une supplémentation alimentaire en DHA dans la mise en place d'un microbiote intestinal dont la composition favorise le maintien en bonne santé dans un modèle souris. Dans une première étape, nous donnerons à des souris gestantes un supplément de DHA (quatre formulations différentes seront testées) soit par gavage soit dans les croquettes. Chez ces mères, nous évaluerons l'impact de la supplémentation en DHA sur le lait maternel (mesure du taux de DHA dans le lait) et sur la composition du microbiote intestinal. Dans une seconde étape, nous sélectionnerons les deux sources de DHA les plus performantes au vu des objectifs de notre projet. Le régime alimentaire de femelles gestantes sera additionné de l'une ou de l'autre de ces deux sources de DHA. Nous réaliserons des hystérectomies pour la moitié des mères alors que l'autre moitié aura ses portées par voie basse. Nous comparerons alors les paramètres physiologiques des souriceaux nés de ces deux façons afin d'analyser le bénéfice potentiel d'une supplémentation en DHA chez des animaux nés suite à une hystérectomie. Nous observerons notamment l'inflammation intestinale (dosages sanguins et réponse immunitaire), la composition du microbiote intestinal et la neuroinflammation (mesure de l'expression de certains gènes du cerveau). Ces paramètres nous sont accessibles par des interventions simples et faiblement douloureuses ou stressantes prises de sang, récupération de lait maternel sous anesthésie et de fèces. Nous utiliserons au maximum 1 146 animaux au cours de ce projet (mères et souriceaux compris), soit un maximum de 230 par an.

Ces travaux nécessitent l'utilisation d'animaux vivants car les phénomènes ciblés (développement du cerveau, inflammation intestinale, variation de composition du microbiote) ne peuvent pas être étudiés par des méthodes de substitution. Pour toutes les procédures expérimentales, nous avons calculé le nombre minimal de souris requis afin d'aboutir à des données analysables par méthodes statistiques. D'autres molécules que le DHA pourraient être envisagées, mais nous estimons qu'il s'agit là d'un bon candidat et qu'il n'est pas nécessaire à ce stade d'en inclure d'autres. Nous améliorons le bien-être des animaux via un enrichissement apporté dans les cages (fourniture de cellulose permettant la construction de nids par les animaux), la stabulation en cages collectives, la prise en charge de la douleur si nécessaire. Nourriture et eau sont accessibles en permanence. Nos procédures sont faiblement invasives et de courtes durées (1 mois maximum) néanmoins les animaux sont observés quotidiennement. Par ailleurs, des critères d'arrêt ont été définis (perte de poids pour les mères, absence de gain de poids pour les petits, immobilité).

Nous espérons que ces travaux permettront d'établir les bases de recommandations nutritionnelles pour les mères d'enfants nés par césarienne et permettant de réduire les risques des troubles associés à cette opération.

14398 Les infections virales dont celles des herpèsvirus équin constituent un risque sanitaire majeur pour les équidés et provoquent des pertes économiques importantes pour la filière équine. A titre d'exemple, l'épizootie de rhinopneumonie qui a sévi en France en 2018 a affecté de très nombreux chevaux. Au-delà de l'impact en terme de santé animale, cette épizootie a perturbé nombre de manifestations équestres et entraîné des pertes financières importantes. Cette crise a suscité beaucoup d'émoi et de questionnements au sein des différentes instances dans le monde de l'élevage, de la course, chez les particuliers et vétérinaires.

Parmi les 5 herpès virus équin décrits chez les équidés, les herpès viroses de type 1 et 4 sont généralement nommées rhinopneumonie. L'herpèsvirus équin 1 (HVE-1) est responsable des formes cliniques les plus sévères. Ce virus entraîne des formes respiratoires qui peuvent conduire à l'apparition de formes dites « secondaires » graves les formes abortive et nerveuse. L'HVE-1 demeure aujourd'hui la première cause infectieuse d'avortement malgré une forte diminution des cas enregistrée suite à la commercialisation de vaccins voici plus de vingt-cinq ans. La forme nerveuse conduit dans 50% des cas à l'euthanasie de l'animal. L'herpèsvirus équin 4 (HVE-4), souvent décrit comme très proche de l'HVE-1, est quant à lui responsable essentiellement de la forme respiratoire. Bien que sporadique, des avortements induit par l'infection HVE-4 sont rapportés dans l'ensemble des pays qui surveillent ce pathogène. Deux vaccins sont disponibles en France pour lutter contre les formes respiratoire et abortive de la maladie induite par ces herpèsvirus (HVE-1 et HVE-4). Toutefois, pour de multiples raisons (économique, philosophique, réglementaire) la couverture vaccinale reste bien souvent insuffisante pour assurer une protection optimale de nos populations d'équidés. Ce faible taux de vaccination de la population des équidés en France pourrait être un des facteurs prédominants ayant contribué à l'épizootie de 2018. Il est également important de noter qu'aucun des vaccins disponibles à ce jour n'a été testé contre la forme nerveuse de la maladie, faute de modèle expérimental. Face à cette situation, le recours à un traitement par des molécules antivirales demeure une approche envisageable pour lutter contre l'infection par les herpèsvirus équin et les maladies qui en découlent, et tout particulièrement la forme nerveuse.

Notre laboratoire a développé au cours de ces 3 dernières années un modèle d'étude *in vitro* pour mesurer l'effet des molécules antivirales. Cet outil de criblage, nous a permis de tester l'effet de nombreuses molécules antivirales sur différentes souches d'HVE-1. Les résultats montrent que le ganciclovir et sa prodrogue* le valganciclovir présentent une efficacité *in vitro*, contre l'HVE-1, 10 fois supérieure à celle de l'aciclovir qui est la seule molécule ayant fait l'objet de test *in vivo* chez le cheval à ce jour. Nos résultats sont en accord avec ceux d'une équipe argentine qui a mené des études *in vivo* et *in vitro* avec ces deux molécules (aciclovir et ganciclovir) pour lutter contre un autre herpèsvirus équin, l'HVE-3 (exanthème coïtal).

Sur la base de ces résultats *in vitro*, cette étude a pour objectif de mesurer l'efficacité du Valganciclovir chez l'espèce cible dans le cadre d'une infection par le virus HVE-1.

Ce projet nécessitera l'utilisation de 8 poneys âgés de 10 mois.

L'effet du valganciclovir (groupe traité, n=4) sera comparé à un placebo (groupe contrôle, n=4) dans le contexte d'un challenge infectieux par EHV-1 en mesurant

1) la réduction de signes cliniques caractéristiques de l'infection respiratoire à HVE-1 chez le poney en condition d'infection expérimentale que sont l'hyperthermie, la toux, le jetage, l'anorexie, la dyspnée et l'adénopathie des ganglions lymphatiques sous-maxillaires. En raison de l'âge des animaux, le risque d'apparition de la forme nerveuse est faible.

2) la réduction de l'excrétion virale (marqueur de transmission du pathogène) ainsi que la virémie cellulaire (étape déterminante pour le développement des formes secondaires sévères).

Nous proposons de réaliser cette étude avec une souche HVE-1 de terrain ayant été isolée en France en 2009 à partir d'épizooties bien documentées.

Nous avons déterminé la dose du traitement valganciclovir qui sera administré sur la base d'une étude récente de pharmacocinétique.

Ce projet de recherche permettra d'évaluer *in vivo* pour la première fois chez l'équin l'effet d'une molécule antivirale présentant une efficacité *in vitro* 10 fois supérieure à celle de l'aciclovir, molécule faisant l'objet des rares études publiées pour le traitement des infections à HVE-1. Nous espérons

ainsi pouvoir proposer un traitement efficace contre l'infection par HVE-1 dont les formes nerveuses conduisent trop souvent à l'euthanasie de l'animal.

Ce projet est en accord avec la règle des 3R

Remplacement Cette étude est l'aboutissement d'un projet de screening de molécules réalisé *in vitro* et a pour objet d'évaluer sur l'espèce cible l'efficacité d'une molécule antivirale ayant démontré son activité *in vitro*.

Réduction Le nombre de poneys par groupe permet de mesurer de manière significative une réduction de 40% ou plus de l'excrétion de HVE-1 tout en prenant en compte la disponibilité des animaux et les contraintes de confinement liées à la nature infectieuse de ce protocole.

Raffinement afin de limiter le stress des animaux lors des manipulations et de prélèvements répétés lors de l'étude un programme de training sera mis en place dès le sevrage des animaux incluant des méthodes de renforcement positif. Tout au long de l'étude les animaux bénéficieront d'un enrichissement matériel sous forme de brosses disposées dans l'espace de vie.

* Une prodrogue est une substance pharmacologique qui est administrée sous une forme inactive (ou beaucoup moins active que son métabolite). Une fois administrée, la prodrogue est métabolisée *in vivo* en un métabolite actif.

14399 Les cellules dendritiques (DC) sont les sentinelles de notre corps elles sont capables de détecter des cellules infectées par des pathogènes, et d'en instruire les lymphocytes qui ont la capacité de détruire les cellules concernées. Les DC représentent une population très très rare des cellules immunitaires chez l'homme. Pourtant elles sont de puissantes activatrices de nos réponses immunitaires. Cependant, de nombreux aspects concernant l'importance des DC dans la réponse immunitaire restent encore inconnus. Pourquoi les DC sont-elles des cellules incontournables de notre système immunitaire ? Comment sont-elles capables d'activer efficacement les lymphocytes ? Comment nous permettent-elles de contrôler rapidement et efficacement des infections virales (virus de l'herpès, variole ou rhynopharingique) et des infections bactériennes (*Listeria*) ? Nos travaux sur les DC permettront de répondre à ces questions fondamentales et permettront de mieux maîtriser les fonctions thérapeutiques des DC chez l'homme.

Le projet proposé permet d'identifier les mécanismes moléculaires qui permettent aux DC d'activer des lymphocytes dans un tissu infecté. Ce projet s'articulera autour de 3 grands axes

- 1- Analyser l'importance des DC dans nos réponses immunitaires lors d'infections virales et bactériennes
- 2- Analyser par quels mécanismes les DC activent les lymphocytes lors d'infections virales et bactériennes
- 3- Analyser où et comment les DC contactent les lymphocytes. Observations de tissus infectés par microscopie.

Nous appliquerons dans notre projet la règle des 3R.

Remplacement : Ce projet nécessite la mesure de différents paramètres de la réponse immunitaire au cours d'infections la production de facteurs pro-inflammatoires, l'activation des DC et des lymphocytes, la réplication virale et bactérienne, le recrutement des lymphocytes et des DC du sang dans les tissus infectés, leur localisation dans les tissus par rapport aux cellules infectées. Ainsi l'intégration d'un système vivant et complet est indispensable. La physiopathologie de la souris est suffisamment proche de celle de l'homme pour que son étude nous permette d'accroître nos connaissances sur le fonctionnement du système immunitaire chez l'homme. Par ailleurs, la taille, la rapidité du cycle de reproduction et la génétique de la souris en font le modèle le mieux approprié pour les études envisagées pour lesquelles des animaux génétiquement modifiés sont nécessaires. Ainsi le modèle murin est un modèle de choix pour notre étude.

Réduction : Nous utiliserons 3839 souris pour mener à bien cette étude qui se déroulera sur 5 ans. Le nombre d'animaux reste prévisionnel si, pour certains groupes d'animaux, aucune différence significative n'est obtenue lors de certaines procédures, nous ne poursuivrons pas les expérimentations sur ces groupes. D'autre part, les expériences d'imagerie ne seront réalisées

uniquement si des résultats préliminaires justifient leur utilisation. Cela permettra de limiter les opérations chirurgicales au plus petit nombre possible d'animaux. Chaque expérience sera répétée indépendamment deux fois, avec 4 animaux par groupe, minimum requis pour s'assurer de la bonne reproductibilité des résultats.

Raffinement : Pour limiter le stress des animaux, les souris seront élevées dans des animaleries conventionnelles et de niveau 3 exemptes d'organisme pathogène spécifique (EOPS). Les animaux seront gardés tant que possible en groupes sociaux stables formés d'individus compatibles (5 animaux/cage), et une période d'acclimatation d'une semaine sera respectée avant leur entrée dans les procédures. Ils disposeront d'un environnement enrichi avec la disposition de matériel pour confectionner des nids et des dômes protecteurs. Pour les animaux affaiblis, l'accès à la nourriture et à l'eau sera favorisé. Pour certains animaux génétiquement modifiés plus sensibles aux infections, il ne sera pas possible de remédier à leur souffrance dans la mesure où les analgésiques modifient également les réponses immunitaires étudiées et pourraient influencer sur l'histoire naturelle de la maladie, donc sur la finalité expérimentale. Cependant, dans toutes les procédures décrites, une grille d'évaluation de la douleur sera scrupuleusement appliquée pour détecter tous signes de souffrance, stress et anxiété relatifs à l'expérimentation en cours, et les animaux atteignant un score de 6/6 seront immédiatement euthanasiés.

Toutes les procédures de ce projet se concluent par la mise à mort de la totalité des animaux.

14400 Le rôle du cœur est de faire circuler le sang dans l'organisme. Lors d'un arrêt cardiaque, le sang ne circule plus. Tous les organes (en priorité le cerveau) sont privés de nutriments et d'oxygène et une mort cellulaire survient rapidement. L'arrêt cardiaque touche en Europe près de 700 000 patients par an et s'associe à une mortalité de 90%. En France, la maladie cardiovasculaire reste la première cause de mortalité chez les femmes et la seconde chez les hommes. Quand l'arrêt cardiaque est réfractaire (durée >30 minutes malgré des manœuvres de réanimation supervisées par un professionnel médical), la mise en place d'un « cœur artificiel externe », une pompe veino-artérielle appelée ECMO (Extra corporeal membrane oxygenation) permet de refaire circuler le sang en aspirant le sang veineux dans la veine fémorale et en le réinjectant dans l'artère fémorale le sang circule à nouveau dans l'organisme et les cellules reçoivent oxygène et nutriments. Au décours de la mise en place de l'ECMO, le sang circule à nouveau mais l'inflammation de l'organisme est telle qu'il existe une dilatation des vaisseaux artériels et une fuite d'eau du sang vers les tissus qui s'accompagne d'un état d'hypovolémie intense (diminution du volume sanguin). Tout cela conduit à une chute de la pression artérielle, en dessous de la pression nécessaire pour perfuser les organes et à des désamorçages de la pompe (le patient est tellement hypovolémique qu'il n'y a plus assez de volume sanguin veineux à aspirer pour assurer un débit sanguin dans la pompe artificielle compatible avec la vie).

Pour éviter cela, le patient bénéficie d'une réanimation standard avec un traitement composé de « remplissages » (on injecte au patient plusieurs litres de sérum physiologique pour corriger l'hypovolémie) et un traitement par vasopresseur (càd NORADRENALINE, un médicament vasoconstricteur qui va corriger la dilatation des vaisseaux).

Cependant on sait que ces remplissages ne sont pas démunis de toxicité et sont même associés à une surmortalité si le volume total utilisé devient trop important. Certains traitements comme l'albumine permettent d'augmenter le volume sanguin en réalisant des remplissages de plus petits volumes. D'autre part, l'utilisation de fortes doses de noradrénaline ainsi que l'absence de réponse favorable peuvent être observées et le clinicien peut être amené à utiliser d'autres thérapeutiques. L'utilisation de vasoconstricteurs différents, tel que le bleu de méthylène, dans le traitement de ces états de vasodilatation généralisée pourrait être proposé devant la résistance aux catécholamines.

A notre connaissance, il n'existe pas d'étude clinique ou animale robuste étudiant l'intérêt de l'albumine ou du bleu de méthylène dans les états de choc rencontrés après réanimation d'un arrêt cardiaque réfractaire traité par assistance circulatoire extra-corporelle.

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'efficacité de nouvelles thérapeutiques dans ce modèle de choc post arrêt cardiaque sous assistance circulatoire extra-corporelle.

Le projet comprend deux études distinctes

Etude 1 Evaluer l'efficacité de l'albumine sur le remplissage et la fuite d'eau des vaisseaux

Etude 2 Evaluer l'efficacité du bleu de méthylène dans le traitement de la vasodilatation.

Afin de réduire au maximum le nombre de cochons nécessaire à ces deux études, il a été décidé de constituer un groupe contrôle commun. Le projet sera donc constitué de trois groupes de 10 cochons

1-un groupe soumis à une réanimation standard seule (remplissages au sérum physiologique + noradrénaline),

2-un groupe soumis à une réanimation standard + Albumine,

3-un groupe soumis à une réanimation standard + Bleu de méthylène.

Ce projet permettra de réaliser 2 études une première comparant « Réanimation standard + albumine » et « Réanimation standard seule » et une seconde comparant « Réanimation standard + Bleu de méthylène » et « Réanimation standard seule ».

Le modèle animal de cochon est utilisé pour sa similitude avérée, en termes d'hémodynamique et de morphologie cardiaque, avec les processus physiologiques rencontrés en clinique. L'adaptation à l'environnement physiologique direct du cœur nous conduit à réaliser cette étude sur un modèle animal où toutes les contraintes seront présentes (impossibilité de remplacement).

Ce projet utilisera 30 porcs adultes (poids = 50-60kg) permettant ainsi une étude statistiquement exploitable. Afin de réduire au maximum le nombre de cochons nécessaire à cette étude, nous avons décidé d'associer les 2 projets différents (intérêt de l'albumine et intérêt du bleu de méthylène) et de constituer un seul et même schéma expérimental avec un seul groupe contrôle commun permettant donc ainsi de réduire le nombre de cochons. De plus, ce modèle est déjà en place et maîtrisé dans notre structure. L'arrêt cardiaque sera provoqué par une ligature coronaire puis après 30 minutes (mise en place du choc post-réfractaire), une assistance circulatoire (ACE ou ECMO) sera mise en place et 3 thérapeutiques seront testées selon le groupe tiré au sort Bleu de méthylène ou Albumine ou Réanimation standard seule afin de déterminer leur implication et leur bénéfice. L'ensemble du protocole sera réalisé sous anesthésie générale avec un niveau de sédation comparable à celui utilisé en clinique chirurgicale chez l'homme.

Les conditions d'hébergement des animaux (enrichissement du milieu), de soins (points limites) et surtout les méthodes utilisées (opérations sous anesthésie générale, analgésie contrôlée) qui sont des méthodes dérivées directement de la pratique clinique, assurent le bien-être de l'animal durant la phase expérimentale et permettent ainsi un raffinement de la méthodologie.

14401 L'hypertension artérielle (HTA) est une maladie caractérisée par une pression anormalement élevée du sang dans les vaisseaux sanguins (Pression artérielle systolique (PAS) ≥ 140 mmHg et/ou pression artérielle diastolique (PAD) ≥ 90 mmHg). Dans l'immense majorité des cas, l'HTA est dite essentielle car aucune cause connue ne peut expliquer son apparition. Néanmoins, elle peut être secondaire à d'autres maladies cardiovasculaires et/ou métaboliques ou à des traitements médicamenteux. Par exemple, l'HTA est fréquemment associée au diabète, environ 50 % des diabétiques ont une HTA déclarée, constituant un facteur aggravant de toutes les complications. Dans le monde, plus d'un adulte sur trois souffre d'HTA et c'est la maladie chronique la plus fréquente en France. En absence de traitement, l'HTA peut entraîner des complications graves au niveau cardiovasculaire, cérébrovasculaire ou au niveau de certains organes cibles (rein, rétine ...), c'est la première cause évitable d'accident vasculaire.

L'objectif de ce projet est donc d'évaluer l'effet de nouveaux composés sur la pression artérielle (PA). Soit, dans le but d'analyser leur efficacité sur le traitement de l'HTA et de compléter ainsi l'arsenal thérapeutique disponible actuellement. Soit, afin de s'assurer de l'absence d'effet indésirable sur la PA d'un nouveau produit dédié à d'autres indications thérapeutiques.

L'utilisation d'un modèle animal est nécessaire dans ce contexte car aucun modèle *in vitro* ne permet d'étudier cette pathologie (remplacement) dont l'apparition est la résultante de la dérégulation de plusieurs mécanismes physiologiques.

Les effets des composés sont donc évalués en fonction de l'objectif de l'étude, soit sur un animal présentant des maladies cardiovasculaires et/ou métaboliques représentatif de la pathologie humaine (rat hypertendu et/ou diabétique) pour analyser une efficacité soit sur un animal normotendu pour s'assurer de l'innocuité. Les composés à tester sont administrés chez l'animal et la PA est mesurée par la suite chez l'animal éveillé pour l'évaluation de leurs effets. La mesure de la PA se fait par la méthode de télémétrie qui permet de mesurer plusieurs paramètres physiologiques (tels que la PA, la fréquence cardiaque etc...) en continu chez l'animal éveillé et libre dans sa cage après implantation d'un capteur télémétrique, de manière répétée et pour une durée pouvant aller jusqu'à plusieurs mois. Les composés qui seront analysés ont préalablement été étudiés *in vitro* et dont la cible thérapeutique suggère un effet sur la PA (réduction). Du fait des connaissances des procédures liées au projet et de l'expérience du personnel y participant, il est possible de réduire au minimum (réduction) le nombre d'animaux inclus dans un groupe de traitement à n=12 pour réaliser des statistiques acceptables, soit un nombre total de rats de n=600 pour l'intégralité du projet sur 5 ans.

Les protocoles d'anesthésie et d'antalgie adaptés à la sévérité des procédures expérimentales seront suivis assidûment. Ensuite, un suivi quotidien de l'état général et du poids de l'animal sera réalisé dès la mise en place d'un traitement, pour une action rapide en cas d'état de souffrance de l'animal. Enfin, les rats seront hébergés par 2 par cage dès que possible et tant que le protocole le permet afin de favoriser leur interaction sociale et réduire leur stress, et un enrichissement adapté à leur espèce sera mis en place systématiquement (raffinement). Afin de compléter les données, des analyses biochimiques, de biologie moléculaire et histologique pourront être réalisées *ex vivo* à partir de sang, recueil d'urine ou d'organes prélevés chez les animaux.

14402 Des données de plus en plus nombreuses indiquent que des protéines impliquées dans la croissance des cellules sont également des régulateurs importants du métabolisme de la cellule. Dans ce contexte, nous nous intéressons à un régulateur important de la prolifération et du métabolisme des cellules : la protéine E4F1. Nos données indiquent q'E4F1 est essentiel pour l'homéostasie de la peau et plus précisément pour la fonction des cellules souches de la peau et la maturation des cellules majoritaires de la peau appelées kératinocytes. Notre objectif est maintenant d'étudier les mécanismes par lesquels E4F1 influencent la fonction des mélanocytes, une autre population de cellules présentes dans la peau qui est responsable de la pigmentation de la peau et la protège des dommages induits par les rayonnements ultra-violet (UVs). Ces cellules sont à l'origine de nombreuses pathologies chez l'homme telles que le vitiligo ou encore le mélanome, dont l'incidence ne cesse d'augmenter, ce qui en fait un problème de santé publique majeur.

Pour répondre à nos hypothèses, nous utiliserons différents modèles de souris génétiquement modifiées nous permettant d'inactiver le gène E4f1 spécifiquement dans les mélanocytes et d'évaluer les conséquences sur l'homéostasie de ces cellules. Des tissus seront prélevés et des mélanocytes primaires isolés à partir de ces animaux et les effets sur la pigmentation seront évalués dans différents contextes visant à corriger les défauts métaboliques associés à la perte du gène E4f1. Ces tests seront réalisés sur différentes cohortes d'animaux décrites en détails dans ce document dans le respect strict de la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). Les dispositions prises pour l'application de la règle des 3R sont les suivantes

- « Réduire » le nombre d'animaux en expérimentation. Nous avons prévu d'utiliser un nombre minimum mais suffisant d'animaux pour garantir la puissance statistique de nos résultats expérimentaux.

- « Raffiner » la méthodologie utilisée, ce qui implique la notion de points limites (critères d'interruption) : nous allons porter une attention particulière au bien-être de nos animaux avec un suivi quotidien des animaux.

- « Remplacer » les modèles animaux Nous travaillons sur des modèles de souris qui représentent à ce jour le meilleur modèle animal pour déterminer génétiquement le rôle d'un gène d'intérêt dans

le lignage mélanocytaire. Il n'existe pas de modèle d'étude *in vitro* alternatif connu à ce jour permettant d'étudier les mélanocytes.

Pour l'ensemble de ce projet nous avons prévu un nombre total de 180 souris réparties sur 18 groupes expérimentaux distincts qui seront analysés sur une durée de 5 ans. Les animaux utilisés feront l'objet d'une surveillance journalière et leur milieu sera enrichi à l'aide de litière mélangée à des copeaux, ainsi que de briques de peuplier.

14403

L'analyse de bioimpédance ou bioelectrical impedance analysis (BIA) en anglais, est une analyse de la composition de tissus biologiques par la mesure de leur impédance électrique. La valeur de l'impédance électrique d'un tissu biologique ou bioimpédance est en partie liée à sa teneur en eau et donc à sa teneur en gras. Cette technique a été initialement développée pour des applications médicales, en particulier pour caractériser l'évolution de l'état de santé de patients pour certaines conditions ou pathologies métaboliques.

Dans le cadre de l'étude des poissons, la BIA est utilisée pour évaluer la condition des individus ou des populations sauvages. Cette technique a pour avantage d'être relativement simple à mettre en place, peu coûteuse et ne demande pas le sacrifice de l'animal. De nombreux travaux expérimentaux montrent que la BIA est une mesure intégrative susceptible de refléter un grand nombre de processus biologiques. Comme toute mesure sur le vivant, elle est potentiellement affectée par les conditions de mise en oeuvre. Il est important, donc, de mieux comprendre les facteurs environnementaux et les processus physiologiques qui influencent la bio-impédance des tissus des poissons.

L'objectif majeur de l'étude est de mieux exploiter cette mesure intégratrice de l'état physiologique dans les études appliquées à la conservation des populations sauvages. De plus les résultats de l'étude auront un apport scientifique important en relation avec les pratiques piscicoles. L'ambition à long terme est d'intégrer un capteur BIA dans une marque électronique afin de mesurer la bioimpédance *in situ* le long des trajectoires des poissons en haute mer. Chez les poissons, les processus biologiques qui affectent la bioimpédance pourraient être à longue terme, tels que des variations de l'état nutritionnel ou reproductif, mais aussi à courte terme, par exemple des variations de la température corporelle ou de l'activité physiologique et métabolique. Il en résulte que l'utilisation des mesures de bioimpédance requiert une meilleure compréhension, d'une part, des processus biologiques qui peuvent influencer le signal et, d'autre part, des informations biologiques que la mesure peut fournir.

La présente demande concerne des procédures d'expérimentation sur deux espèces emblématiques en Méditerranée et importantes dans la pisciculture la dorade royale *Sparus aurata* et le loup *Dicentrarchus labrax*.

L'objectif spécifique est de placer des électrodes sous cutanées pour la mesure *in-vivo* de la bioimpédance. Cela afin d'évaluer si l'activité des muscles squelettiques, pendant la nage, influence la mesure de bio-impédance. Le choix d'utiliser deux espèces est pour évaluer si les effets peuvent être espèce-spécifique.

Les protocoles suivent la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner) :

- Remplacer : Il n'est pas possible remplacer des animaux pour ces études, qui impliquent la mesure de signaux bioélectriques *in vivo*. Il n'existe pas de modèle électrique du poisson et encore moins de l'influence de son activité sur la bioimpédance.

- Réduire : Ces expériences novatrices, sur les mesures de la bioimpédance pendant un effort de nage, nécessitent $n = 12$ individus de chaque espèce, afin de permettre des tests statistiques des effets dans chaque espèce, et une comparaison valide entre espèces.

- Raffiner : Les protocoles d'expérimentation qui impliquent le placement sous cutané des électrodes en acier inoxydable (diamètre entre 0.2 et 0.6 mm), pour l'analyse de signaux bioélectriques *in-vivo*, sont bien établis chez les poissons. L'objectif des protocoles est de limiter au minimum la souffrance et le stress des animaux, avec utilisation approprié d'anesthésie avec

ventilation des branchies pendant le placement des électrodes, suivi par un temps de récupération de la chirurgie d'au moins 24h, avec protection des poissons de toute nuisance visuelle et sonore pendant la récupération et les expériences. Cela permet d'obtenir des mesures physiologiques valides et fiables, qui ne sont pas influencées par un état de souffrance, stress ou agitation de l'animal.

14404 Ce projet concerne l'évaluation de produits immunologiques dans le cadre de développements de produits destinés à protéger des espèces de carnivores domestiques contre certaines maladies infectieuses microbiologiques.

Il repose sur l'évaluation de l'efficacité des produits immunologiques vis-à-vis d'un pathogène. Ce projet est composé de 2 procédures, la mise au point d'épreuve et l'évaluation de l'efficacité des produits immunologiques. Ces 2 procédures sont basées sur les textes réglementaires, les connaissances acquises et les données bibliographiques le cas échéant.

Ces 2 procédures comprennent un niveau de suivi adapté à la gravité décrit dans chaque protocole d'étude. Il sera constitué d'un suivi clinique adapté à la pathologie associée à chaque fois que nécessaire à un suivi des paramètres biologiques tels que hémato-biochimiques, sérologiques, immunocellulaires, histologiques, virologiques et bactériologiques.

Ce projet est conçu en accord avec les textes en vigueur de la Pharmacopée Européenne, de la monographie générale 0062, de la monographie 50207 relative à l'évaluation de l'efficacité des vaccins à usage vétérinaire et des monographies spécifiques des pathologies ainsi que les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement (3R), avec notamment

- un caractère de stricte nécessité ces procédures ne peuvent pas, pour le moment, être remplacées par des méthodes alternatives car elles répondent à l'obligation réglementaire ou scientifique d'être conduites sur l'espèce de destination du produit. Le modèle rongeurs peut être utilisé le cas échéant, afin de réaliser des études préliminaires sur la virulence d'un pathogène et/ou de l'efficacité d'un produit immunologique;
- un nombre d'animaux envisagé soit
- En conformité avec la réglementation et la pharmacopée
- Etayé à l'aide d'un raisonnement scientifique et/ou d'une analyse statistique et/ou d'une recherche bibliographique permettant l'atteinte de l'objectif du projet.

Au total, les nombres maximums de 1200 carnivores domestiques et 5000 rongeurs sur 5 ans seront utilisés dans ce projet

- un hébergement des animaux en groupe avec présence d'enrichissement de manière à limiter le stress
- un recours à l'anesthésie générale, si nécessaire, pour garantir le bien-être animal
- des suivis cliniques fréquents et réguliers des animaux réalisés tout au long des procédures
- des points limites adaptés et précisément définis afin d'éviter toute souffrance des animaux.

14405 Contexte scientifique Notre équipe effectue des travaux de recherche sur des cancers agressifs chez l'enfant des tumeurs du cerveau (gliome).^[SEP] Le gliome du tronc cérébral (DIPG) est un cancer de mauvais pronostic. Aucune option thérapeutique ne prolonge la vie des patients atteints de DIPG. Il est important de découvrir et de valider de nouvelles stratégies thérapeutiques, de concevoir de nouveaux médicaments et des systèmes d'administration de médicaments pour ces cancers. Il faut prendre en compte la sensibilité élevée des enfants aux médicaments anticancéreux.^[SEP] Nos priorités sont 1) étudier la capacité des cellules tumorales à former des tumeurs dans des modèles précliniques *in vivo*, chez la souris, afin de trouver leurs points faibles^[SEP]. 2) tester l'efficacité de molécules anti-tumorales dans ces modèles afin de valider de nouvelles stratégies de traitement.^[SEP]
Descriptions des objectifs du projet Nos études *in vitro* ont mis en évidence une nouvelle cible thérapeutique encore méconnue dans ces tumeurs Notre projet vise donc à valider sa pertinence *in vivo*. Nous avons synthétisé des inhibiteurs de cette cible (GSK126). Nous souhaitons comparer

l'efficacité de cette molécule innovante au traitement de référence de ce type de cancer (panobinostat) dans un modèle de cancer sous cutanée puis dans un modèle plus proche de la maladie à savoir en injectant des cellules tumorales dans le cerveau des souris.

Le bénéfice attendu est de pouvoir offrir à ces enfants malades un traitement plus efficace et moins toxique.

Dans le respect de la règle des 3R :

-Afin de restreindre le nombre d'animaux, nous combinerons nos lots témoins. De plus, le nombre d'animaux a été défini d'un point de vue statistique afin de réduire leur nombre.

-En matière de raffinement : le bien-être de nos animaux sera pris en compte dès leur naissance jusqu'à leur mort : hébergement en cages collectives, enrichissement de l'environnement et points limites précoces adaptés afin d'éliminer ou de réduire toute douleur, souffrance, angoisse et dommage susceptible d'être infligé à ceux-ci.

-Remplacement : Nous avons partiellement remplacé les études *in vivo* par des études préalables *in vitro*. Nous avons cependant désormais besoin d'utiliser des animaux car le mécanisme que nous étudions est trop complexe pour être modélisé sans expérimentation *in vivo*.^[L]_[SEP]

Pour réaliser l'ensemble de nos expériences nous demandons l'utilisation de 240 souris.

14406 Au niveau mortalité, en France le cancer du colon se trouve au 2e rang derrière le cancer du poumon, et au 4ème rang mondial, ce qui en fait un véritable enjeu de santé publique. Les facteurs de risques environnementaux et génétiques permettant le développement de ce cancer sont complexes et hétérogènes. Le mode de vie, l'alimentation, et des mutations somatiques/germinales en font partie. Au niveau génétique, plusieurs étapes se succèdent et nécessitent une accumulation de mutations de gènes. Récemment il a été observé que l'expression de l'Apeline, une hormone ainsi que celle de son récepteur APJ, sont augmentées au cours de certains cancers, y compris le cancer colorectal. Dans ce projet de recherche nous évaluerons directement l'implication de l'apeline et de son récepteur dans le cancer colorectal en utilisant les souris déficientes pour l'apeline ou le récepteur APJ. Dans des souris normales, des souris déficientes pour APJ et des souris déficientes pour apeline, nous voulons induire chimiquement des tumeurs dans le colon. Nous pourrions ainsi évaluer l'importance et le rôle de ces deux molécules dans la progression du cancer colorectal.

Les expériences seront menées dans le respect de la règle des 3R :

-Remplacer : l'utilisation de modèles *in vivo* comme la souris est indispensable à la compréhension des mécanismes d'action lors du développement du cancer colorectal dans un organisme entier proche de l'homme, incluant des paramètres comme le microenvironnement, les contraintes physiques, immunologiques etc. qui ne sont pas retrouvés *in vitro*. Cette étape est également nécessaire puisque nous envisageons une potentielle et future utilisation chez l'homme comme thérapie.

-Réduire : afin de limiter au maximum le nombre d'animaux, le nombre sera réduit le plus possible afin d'avoir des résultats statistiquement significatifs (lots de 10 animaux par condition).

-Raffiner : le bien-être de l'animal au quotidien est nécessaire au bon déroulement de nos expériences, mais également à la répliquabilité de nos résultats. Des enrichissements (tunnels polycarbonate) sont présents dans les cages. Un suivi attentif par du personnel compétent et formé, weekend compris, sera également mis en place.

Le nombre total d'animaux nécessaires à ce projet est estimé à 120.

14407 La communication entre les neurones passe par des structures appelées « synapses », qui assurent la transmission de signaux électriques ou chimiques d'un neurone à un autre. La transmission synaptique régule des fonctions telles que la mémoire et l'apprentissage. Ainsi, des altérations du nombre ou de l'efficacité de ces synapses sont impliquées dans une multitude de troubles psychiatriques telles que la schizophrénie. A la surface des neurones se trouvent des molécules spécialisées dans la communication entre les cellules, les récepteurs aux neurotransmetteurs. Cette

communication est modulée par des régulateurs de la libération de ces neurotransmetteurs et jouent donc un rôle très important dans de nombreuses synapses. Une synapse particulière appelé fibre moussue, se situe dans une région du cerveau importante pour l'apprentissage et la mémoire, l'hippocampe et relie les cellules granulaires et les cellules pyramidales. L'objectif du projet est d'étudier l'implication des mécanismes trans-synaptiques à la fibre moussue. En particulier, nous nous intéresserons au canal TRPM3 car 1) celui-ci est fortement exprimé dans les cellules granulaires et 2) son rôle a été démontré dans le système nerveux périphérique. Notre objectif sera donc de comprendre le rôle physiologique de TRPM3 et les mécanismes de signalisation à cette synapse.

Pour cela nous utiliserons la lignée de souris génétiquement modifiée pour ce gène TRPM3. Nous comparerons des souris sauvages et invalidées pour ce gène à l'aide d'une approche pharmacologique pour étudier la physiologie de ce canal. Nous étudierons les courants synaptiques (l'électrophysiologie) sur des tranches de cerveau après leur mise à mort. Nous prévoyons un total de 100 souris.

Pour le respect de la règle des 3R :

1) La qualité de ces tranches de cerveau est déterminante pour pouvoir faire l'enregistrement d'un plus grand nombre possible de cellules par tranche donc par cerveau. Nous nous attachons donc à mettre en œuvre des protocoles standardisés et reproductibles, ce qui nous permet de réduire le nombre d'animaux utilisés.

2) Les modèles de remplacement *in vitro* actuellement disponibles ne récapitulent pas l'architecture du cerveau et ne permettent pas d'étudier les mécanismes de communication au sein de réseau de neurones.

3) En terme de raffinement, nous avons défini les conditions d'enrichissement du milieu pour nos animaux (nids, tunnels, maintien de groupes sociaux stables), afin qu'ils puissent s'adonner à des comportements naturels (fouissage, redressement, fabrication de nids), sans pour autant perturber de façon majeure la fonction synaptique. Pour nos expériences « *ex vivo* » nécessitant l'euthanasie préalable de nos animaux, nous appliquons rigoureusement les prescriptions réglementaires en fonction de leur âge et du protocole mis en œuvre qui garantit une mort sans stress, ni souffrance.

14408 Les lignes directrices internationales rendent obligatoires les études de Pharmacologie de Sécurité avant la 1ère administration d'une nouvelle molécule candidat-médicament chez l'Homme. La nécessité d'étudier la pharmacologie de sécurité des médicaments ou nouvelles formules oblige à recourir à des études *in vivo*, selon les recommandations réglementaires. L'objectif de ces études conduites chez l'animal est la mise en évidence d'effets potentiellement néfastes de ces nouvelles molécules sur les fonctions vitales (cardiovasculaire, respiratoire et système nerveux central). Dans le cadre de ce projet, seule la fonction système nerveux central est étudiée. Ce projet comprend des procédures permettant l'évaluation de la fonction du système nerveux central chez le rongeur d'une part. D'autre part, des procédures utilisant des larves de poisson Zebrafish et des rongeurs permettent d'évaluer le potentiel effet convulsivant des candidat-médicaments. Les molécules sont évaluées en amont sur des tests *in vitro* utilisant par exemple des cellules neuronales ou des tranches de cerveau mais aucun de ces modèles ne permet d'évaluer complètement l'effet des molécules sur le cerveau notamment en termes de comportement général, de température corporelle, d'activité locomotrice et de redressements. Il est donc nécessaire d'utiliser l'animal.

Les études réalisées au sein du centre de recherche, par du personnel formé et compétent, sont encadrées par des recommandations internes, intégrant tous les aspects affectant l'utilisation des animaux (éthique, hébergement, soins, manipulations, expérimentations). S'agissant d'évaluation neurocomportementale sur animal vigile, l'utilisation d'anesthésique ou d'analgésique n'est pas compatible avec les objectifs expérimentaux. Cependant les études couvertes par ce projet sont de courte durée et les produits sont testés le plus souvent avec une seule administration ce qui limite la contrainte subie par l'animal. De plus, le suivi clinique permet la détection précoce de toute douleur ou détresse chez l'animal et la mise en application de critères d'arrêt anticipés. Un support en biostatistiques est apporté par des experts de la spécialité, afin d'optimiser les méthodes

expérimentales employées, et réduire le nombre d'animaux utilisés. Pour certaines molécules, le regroupement de plusieurs tests sur les mêmes animaux peut être approprié et permet la réduction du nombre d'animaux utilisés. Tous ces éléments assurent l'application maximale du principe des 3R. Au maximum, ce projet concerne un total de 18624 animaux dont 14400 larves de poissons Zebrafish et 2052 rats et 2172 souris sur 4 ans.

14409 Le cœur est un organe qui par ses contractions rythmiques synchronisées assure son rôle de pompe au sein de l'organisme. La fréquence des battements est modulée par le système nerveux pour permettre au cœur de s'adapter à la demande de l'organisme. Lors d'un infarctus du myocarde, une artère du cœur se bouche ce qui provoque une souffrance et une inflammation du muscle cardiaque. La fonction de pompe du cœur est alors profondément altérée avec une désynchronisation des contractions du fait de la mort d'une partie des cellules du cœur et d'une modification de l'innervation du cœur par les nerfs qui régulent sa fonction. Apparaissent alors des troubles du rythme cardiaque qui peuvent alors être mortel.

La colchicine est un anti-inflammatoire puissant, extrait de la colchique, utilisée dans le traitement des rhumatismes, notamment la goutte, et de la douleur qui y est associée. De par ses effets la colchicine semble également efficace dans l'infarctus en modifiant l'inflammation mais aussi limitant la perte des nerfs du cœur après un infarctus. Le landiolol est quant à lui un bloqueur à effets rapides du système nerveux cardiaque et son utilisation en phase aigüe pourrait activer des signaux de survie des cellules du cœur. Notre travail consiste à trouver les mécanismes responsables de la désorganisation du système nerveux qui régule la fonction du cœur après un infarctus. Pour se faire nous étudions l'effet de deux médicaments couramment utilisées chez l'homme : la colchicine et le landiolol. Ces médicaments nous permettront de savoir si l'inflammation en phase aigue après un infarctus est responsable de la modification de l'innervation du myocarde et des troubles du rythme.

Nous utilisons un modèle de souris d'infarctus aigu soit la Colchicine, soit du Landiolol, soit une association des 2, soit un placebo. Le même principe sera utilisé sur un modèle de souris immunodéprimées (Rag2KO). Un nombre total de 128 souris sera utilisé pour ce projet.

Ce projet propose de comprendre les mécanismes d'action de la Colchicine et du landiolol sur la dénervation myocardique en post infarctus pour améliorer la prise en charge de l'infarctus chez l'Homme

Nous respecterons le principe des 3 R. La physiologie cardiovasculaire et nerveuse des rongeurs présente de grandes similitudes avec celle de l'homme en termes de régulation et de structure morpho-fonctionnelle. En pratique l'évaluation difficile et peu précise de la dénervation sympathique chez les patients nécessite l'apport de modèles animaux classiquement utilisés dans cette indication de recherche. Nous utilisons un modèle de souris bien caractérisée et les doses de médicaments utilisées sont bien établis. Si une alternative est identifiée pendant la réalisation de nos travaux nous Remplacerons notre stratégie immédiatement. Nous avons organisé nos expériences aux mieux pour Réduire le nombre d'animaux nécessaires à l'acquisition des données (utilisation des mêmes souris pour plusieurs expériences, choix de la télémétrie pour acquisition de l'électrocardiogramme sur animaux vigiles, choix de l'échocardiographie pour l'étude de la fonction cardiaque, calcul statistique de l'effectif minimal). Nous avons Raffiné nos approches pour réduire au strict minimum la détresse imposée à ces animaux, et pour apprécier au mieux les points limites (mise en place d'une grille d'évaluation des signes de douleurs; visites quotidiennes par du personnels qualifiés), en utilisant une anesthésie et analgésie avant toute chirurgie et en post-opératoire afin d'éviter la génération de douleur et d'angoisse). Les animaux sont stabulés par cage de 4 sur des portoirs ventilés dans une pièce de l'animalerie agréée A1, sous contrôle permanent des températures, hygrométrie et sous un cycle de lumière (12/12h). En terme d'enrichissement, des plaques de cotons de cellulose (safe square) leur permettant de faire un nid sont ajoutés et les animaux ont des cabanes en plexiglass teinté. Les animaux ont accès à la nourriture et eau ad libitum.

14410 Le rôle du système immunitaire dans le développement des cancers est aujourd'hui clairement accepté. Parmi les cellules immunitaires qui infiltrent les tumeurs, les lymphocytes T CD4+ régulateurs sont associés à un mauvais pronostic chez les patients. Ces cellules ont la capacité

d'inhiber l'action anti-tumorale des autres acteurs du système immunitaire. En plus de ces lymphocytes régulateurs, la cytokine TGF- β a également un rôle dans cette suppression de la réponse anti-tumorale et est aussi fortement associée à un mauvais pronostic. Il est connu que le TGF- β a besoin d'être activé pour agir et que les lymphocytes T régulateurs ont la capacité de le faire en exprimant une intégrine à leur surface. Notre objectif est de déterminer si les lymphocytes T régulateurs sont une source de TGF- β actif au sein des tumeurs afin de mieux comprendre le lien entre ces cellules et cette cytokine. Ce projet nous permettra de savoir si les lymphocytes T régulateurs sont ou non les principaux producteurs de TGF- β actif dans les tumeurs. Comprendre ces mécanismes permettra d'améliorer nos connaissances sur la réponse immunitaire anti-tumorale et d'adapter au mieux les stratégies thérapeutiques aujourd'hui utilisées.

Ce projet implique une analyse à l'échelle de l'organisme entier. Seule l'espèce murine, mammifère de petite taille, dont le système immunitaire est très bien caractérisé et proche de celui de l'Homme, et pour lequel des lignées cellulaires cancéreuses existent, permettra de répondre aux questions biologiques posées dans des conditions physiopathologiques adéquates. L'absence de systèmes *in vitro* alternatifs ne permet donc pas de remplacer ce modèle. Pour cela nous réaliserons des greffes de lignées cellulaires cancéreuses après reconstitution d'un système immunitaire ou dans divers modèles murins.

Des groupes de 3 à 5 animaux adultes, d'âge similaires seront utilisés lors des expériences. L'observation des animaux sera réalisée tous les deux jours par les expérimentateurs et permettra un suivi précis des points limites et de limiter toute souffrance animale. Aucun animal ne sera isolé et le milieu des cages ventilées sera enrichi selon les règles de l'établissement hébergeur. Des points limites précoces permettront d'éviter tout signe de douleur ou de stress majeurs et d'arrêter l'expérience au plus vite afin d'éviter toute souffrance à l'animal. Le nombre d'animaux sera réduit à son strict minimum, en veillant à une interprétation statistique correcte des résultats. Les perspectives offertes par ce projet sont riches tant au niveau de la recherche fondamentale, décrivant les mécanismes reliant le TGF- β et les Tregs dans la croissance tumorale, qu'au niveau de la recherche appliquée en ouvrant la voie vers une meilleure compréhension des stratégies thérapeutiques aujourd'hui utilisées.

Pour ce projet, 210 souris seront impliquées sur une durée totale de 5 ans.

14411 Ce projet a pour but de décrire les études de pharmacocinétiques réalisées chez les rongeurs pour le compte de laboratoire pharmaceutique, agropharmaceutique ou vétérinaire.

Chaque étude permet d'évaluer le devenir de substances actives dans l'organisme, afin de répondre aux exigences réglementaires.

Il comprendra soit

-Des études de détermination de biodisponibilité ou exposition

-Des études d'ADME (absorption, distribution, métabolisme, excrétion) pouvant contenir jusqu'à quatre phases :

1. l'absorption de la substance active dans la circulation sanguine
2. la distribution de la substance active dans les tissus et organes;
3. le métabolisme de la substance active
4. l'excrétion (élimination) de la substance active

La quantité de médicament présente dans l'organisme et la durée de sa présence permettent de déterminer les posologies (dose et rythme de prise).

Ces études pourront être réalisées dans le cadre d'études

- de discrimination sur un faible nombre d'animaux (cette approche permet de sélectionner une molécule durant la première phase de développement d'un médicament)
- de sécurité dermale suivant la guidance OCDE 427
- mécanistiques réglementaires basées sur la guidances OCDE 417 (études ADME).

Par année ce projet nécessitera l'utilisation de 2000 animaux soit au total sur 5 ans 7000 souris et 3000 rats seront utilisés

La règle des 3R est appliquée comme décrit ci-dessous

- Remplacer

Pour les études réglementaires un autre modèle n'est pas applicable dans la mesure où ces études rentrent dans un cadre réglementaire obligatoire (Guidances OCDE 427 et 417).

Pour les études non réglementaires il n'existe à ce jour aucun modèle *in vitro* permettant d'étudier dans sa globalité le devenir d'une molécule dans un organisme vivant.

- Réduire

Pour les études réglementaires le nombre minimum utilisé est défini par les guidances.

Pour les études non réglementaires, études précoces dans le développement d'un médicaments, un nombre d'animaux inférieur à celui recommandé par les guidances est utilisé.

Dans la mesure du possible un maximum de données est collecté sur un même animal afin de ne pas avoir à reproduire l'expérimentation (ex prélèvement d'organes en fin de cinétique)

- Raffiner une procédure de point limite est en place au laboratoire pour chaque étude et bien spécifiée dans nos procédures internes (Mode Opérateur Normalisé)

14412 En France, 385 000 cas de cancers sont diagnostiqués chaque année, le cancer représentant la première cause de mortalité chez les hommes et la seconde chez les femmes. Ces trente dernières années, l'émergence de nouvelles technologies a permis de caractériser en profondeur les tumeurs ainsi que leurs infiltrats de cellules immunitaires. La génération d'un environnement immunosuppresseur au sein des tumeurs est le point de départ de l'échappement des cellules tumorales à l'immunosurveillance. Les immunothérapies ont pour but de restaurer cette surveillance immunitaire en recréant un environnement favorable au recrutement et à l'activation des cellules du système immunitaire infiltrant la tumeur. Le présent projet s'inscrit dans cette dynamique thérapeutique.

En effet, le C5a, produit de dégradation du C5, composant de la voie du complément est une anaphylatoxine. C'est un puissant chimio-attractant pour certaines cellules immunitaires. Son récepteur le C5aR est principalement exprimé sur les cellules immunitaires d'origine myéloïde, monocytes, neutrophiles mais également sur des cellules immunosuppressives dérivées de cellules myéloïdes (MDSCs Myeloid Derived Suppressor Cells). Celles-ci contribuent à l'échappement de la tumeur en inhibant la fonction de cellules immunitaires clés dans la lutte anti-tumorale, et leur présence au sein de l'infiltrat tumoral chez les patients est fortement associée à une progression du cancer et à un mauvais pronostic.

Un blocage du recrutement de ces cellules immunitaires vers la tumeur primaire et les niches métastatiques, à travers le blocage de l'axe C5a/C5aR, pourrait ainsi contribuer à la réversion de l'environnement tumoral immunosuppresseur en un environnement immunoactivateur.

Notre laboratoire développe actuellement un anticorps thérapeutique anti-C5aR bloquant l'interaction C5a/C5aR. L'activité de cet anticorps a été préalablement démontrée *in vitro* dans des tests fonctionnels. Le but de ce projet est maintenant d'évaluer l'efficacité d'un anticorps anti-C5aR dans des modèles murins, de déterminer s'il est capable de favoriser la réponse anti-tumorale, qu'il soit injecté seul ou en combinaison avec d'autres molécules thérapeutiques. Les systèmes immunitaires de l'homme et de la souris présentant de nombreuses analogies fonctionnelles, la souris apparaît comme le modèle animal le plus pertinent. Il mime en effet la complexité des interactions des cellules immunes chez l'homme.

Dans ce contexte, afin de respecter la règle des 3 R

- Remplacer et Réduire le nombre nécessaire de souris a été calculé afin de couvrir les différentes études qui permettront d'investiguer les effets anti-tumoraux du blocage du récepteur C5aR et de fournir des résultats statistiquement significatifs. Les données obtenues pour chaque paramètre sur des animaux traités pourront être comparées aux données obtenues sur des animaux ayant reçu

un traitement placebo et/ou un traitement de référence et permettre ainsi l'évaluation précise de l'efficacité de nouveaux candidats médicaments.

Le remplacement des animaux est impossible à mettre en place du fait de la nécessité d'étudier l'efficacité dans un modèle *in vivo* complexe, impossible à mimer *in vitro*.

- Raffiner pour minimiser la douleur et le stress des animaux, les conditions d'hébergement des animaux sont optimisées, par l'enrichissement dans les cages (copeaux de bois compactés et/ou coton), et par le maintien des animaux en groupes de 5 maximum afin d'éviter le stress de l'isolement. Les prélèvements sanguins seront réalisés sous anesthésie générale (gazeuse) et les volumes ainsi que les fréquences de prélèvement suivront les recommandations du CEPAL.

Pour les protocoles nécessitant de la chirurgie, source de douleur, les animaux seront anesthésiés par inhalation ou par injection de drogues anesthésiques par voie intrapéritonéale. Ils seront prémédiqués avec de la buprénorphine et un anti-inflammatoire non stéroïdien afin de réduire les douleurs liées à l'intervention chirurgicale. En post-opératoire, un antidouleur et un anti-inflammatoire seront administrés pendant les 72 heures qui suivent l'intervention. Des tapis chauffants seront utilisés tout au long des interventions chirurgicales.

Dans ce projet, nous planifions l'utilisation d'une lignée de souris génétiquement modifiées pour exprimer à la place de la molécule C5aR murine, la molécule C5aR humaine (C5aRK1). Ces souris sont décrites dans la littérature comme étant normales et ne présentant aucune malformation phénotypique. Le projet s'articulera en plusieurs étapes

- une première étape visant à évaluer les paramètres de pharmacocinétique et de pharmacodynamie des anticorps dans le sang périphérique des animaux. Le but est d'optimiser dans les étapes ultérieures d'efficacité les protocoles d'administration des anticorps.

- dans une seconde étape, l'efficacité anti-tumorale de l'anticorps anti-C5aR, seul ou en combinaison avec d'autres protocoles thérapeutiques de référence (immuno ou chimiothérapies) sera évalué sur des souris ayant été greffées avec des cellules tumorales par voie sous-cutanée ou orthotopique. Les points limites (fixés sur la base de la grille d'évaluation de la souffrance de MORTON et GRIFFITHS 1985 modifiée) relatifs à la perte de poids, à l'apparence et aux volumes des tumeurs (nécrose, volume supérieur à 1800 mm³), à l'apparence et à l'activité des animaux (prostration, poils piqués, isolement, difficultés respiratoires, paralysie.) sont des critères qui justifieront le sacrifice des animaux.

Le nombre d'animaux inclus dans ce projet est évalué à 16128 sur 5 ans.

14413 La pharmacocinétique étudie le devenir de la molécule dans l'organisme. Le devenir du médicament selon les doses utilisées et sa voie d'administration sont étudiés chez l'animal : son absorption, sa distribution par la circulation sanguine, son métabolisme, son élimination.

La pharmacodynamie étudie les effets de la molécule sur l'organisme. Ces effets sont évalués par le suivi des variations de différents paramètres qui peuvent être par exemple biochimiques (changement du taux sanguins d'enzymes hépatiques, du taux de glucose sanguin, modification de la composition des urines), hématologiques (modifications du taux de globules rouges/blancs) ou physiologiques (pression artérielle, fréquence cardiaque, respiratoire).

Les chiens sont régulièrement utilisés pour la recherche biomédicale dans les domaines de santé animale (espèce cible) et humaine.

En tant que sous-traitant de l'industrie pharmaceutique, nous proposons à nos clients de réaliser la phase expérimentale de leurs études.

L'enjeu de ce projet est de réaliser des études chez les chiens qui consistent à administrer aux animaux une molécule à tester et en pratiquant ensuite des prélèvements sanguins par ponction directe dans le but :

-de suivre la concentration sanguine de la molécule (pharmacocinétique).

-de suivre les effets pharmacodynamiques de la molécule (modification de la glycémie, modifications hématologiques).

Des prélèvements urinaires et des prélèvements de bile par l'intermédiaire de cathéters biliaires pourront également être réalisés afin de suivre l'élimination de la molécule ou des modifications dans leur composition (pharmacodynamie). D'autres paramètres pharmacodynamiques pourront être suivis par des appareils de mesures autonomes qui seront placés sur l'animal de manière non invasive ou invasive (chirurgicalement). Les procédures de mise en place des cathéters biliaires et des appareils de mesure autonomes seront décrites dans des projets indépendants.

Des prélèvements tissulaires (site d'injection, biopsie musculaire) pourront également être réalisés afin de mesurer la concentration de la molécule ainsi que son effet (modifications histologiques au site d'injection, réaction au niveau d'organes cibles)

Aucune méthode alternative ne permettant actuellement de reproduire la diffusion d'un produit dans le sang des animaux ni d'évaluer les effets d'une molécule sur un ou plusieurs paramètres pharmacodynamiques au niveau de l'organisme entier, il est indispensable de recourir à l'animal entier.

Au maximum pour ce projet, nous prévoyons de réaliser la phase animale des études pharmacocinétiques de 400 produits au maximum, en 5 ans.

Chaque produit à tester fera l'objet d'une étude particulière. On calculera pour chaque étude le nombre d'animaux nécessaire, il sera toujours réduit au minimum, en tenant compte de la variabilité des résultats attendus.

Au total, au maximum 3600 animaux pourront être utilisés en 5 ans dans ce projet. Le mode d'administration des produits sera fonction du produit à tester mais toujours conforme aux recommandations en vigueur et aux bonnes pratiques vétérinaires.

Les prélèvements sanguins seront toujours réduits au minimum. Ils pourront être réalisés par ponction avec une aiguille à la veine jugulaire, à la veine céphalique, à la saphène ou via un cathéter placé à la veine céphalique.

Toute intervention sur l'animal sera effectuée par une personne habilitée et expérimentée afin de réduire au minimum le stress.

Durant toute la phase expérimentale, les animaux seront hébergés généralement par groupe ou en individuel si demandé par le protocole. Dans le cas d'hébergement individuel, une attention particulière sera portée pour mettre en place un enrichissement du milieu adapté pour éviter l'ennui : contact visuel et olfactif entre congénères, surface suffisante de l'hébergement, présence de jouets, de tablettes.

Un suivi quotidien (voir plusieurs fois par jour) sera mis en place permettant l'observation générale des animaux et la détection précoce d'éventuels effets du produit sur l'animal.

14414 Le terme rhumatisme est un terme générique désignant des pathologies généralement douloureuses, affectant les articulations et les os, ainsi que les muscles, les tendons et les ligaments. Le rhumatisme est une pathologie qui touche toutes les tranches d'âge, ce qui explique pourquoi cette maladie a un fort impact économique.

Ainsi, en rhumatologie, la moyenne d'âge est de 36 ans. Un Français sur trois - soit près de 20 millions de personnes- souffre ou a souffert de rhumatismes, aigus ou chroniques. L'arthrose périphérique (mains, pieds) et les rhumatismes inflammatoires touchent 19 % des personnes.

Les rhumatismes sont des pathologies aux formes très diverses puisque notre corps comprend plus de 200 os et une centaine d'articulations. Il existe plus de 200 maladies rhumatismales. On distingue quatre principaux types de rhumatismes les rhumatismes inflammatoires (polyarthrite rhumatoïde, spondylarthropathies...), les rhumatismes dégénératifs (arthrose...), les affections des parties molles (fibromyalgie...) et les affections osseuses (ostéoporose...).

La polyarthrite rhumatoïde (PR) et les spondylarthropathies sont les deux plus fréquentes maladies articulaires inflammatoires chroniques de l'adulte. Pouvant conduire à des destructions des articulations, la polyarthrite rhumatoïde concerne 300 000 personnes en France. Les spondylarthropathies sont un groupe de maladies inflammatoires chroniques des articulations et des zones d'insertion tendineuse touchant essentiellement les membres inférieurs, parfois le bassin

(articulations sacro-iliaques à l'origine de douleurs fessières) et la colonne vertébrale (douleurs lombaires). Plus de 200 000 personnes sont concernés, en majorité des sujets jeunes. Parmi les rhumatismes dégénératifs, l'arthrose définie par une usure du cartilage touche 6 millions de Français. C'est la plus fréquente des maladies rhumatologiques. La fibromyalgie, atteinte diffuse des insertions des tendons, maladie encore mystérieuse, toucherait entre 2 et 5 % de la population française. Enfin, 3 millions de femmes françaises sont touchées par l'ostéoporose, maladie qui altère la solidité des os et les rend plus sensibles aux risques de fractures.

Il est donc nécessaire de pouvoir évaluer sur des modèles physiologiques intégrés l'impact de nouveaux candidats médicaments pour mieux traiter ces pathologies invalidantes.

Dans le respect de la règle des 3R, et lorsque cela est possible ces candidats sont évalués sur culture cellulaire ou organe isolé préalablement aux tests animaux afin de remplacer ou de réduire le nombre d'animaux impliqués dans les protocoles. Nous utiliserons le nombre minimum de souris nécessaire à une analyse statistique en prenant en compte la variabilité inter-individuelle. D'autre part, un raffinement des protocoles sera effectué en fonction des avancées technologiques dans le domaine. Les souris sont hébergées selon les conditions de la nouvelle réglementation 2010/63 en unités individuelles ventilées de type III ou IV avec enrichissement de l'environnement (composants de nidification et igloo). Chaque animal entrant dans une étude disposera d'une fiche individuelle de suivi sur laquelle tout traitement et observation seront reportés. L'état de santé des animaux sera évalué quotidiennement selon des critères définis par l'AFSTAL, d'apparence physique (perte de poids significative, gêne respiratoire) et comportementaux (souris prostrée, agressivité) définis en accord avec le comité de suivi du bien-être animal de notre établissement. Une dégradation trop importante de l'état de santé (au delà d'un score de 13 selon les critères détaillés dans les procédures expérimentales) pourra entraîner l'arrêt immédiat de l'expérimentation. Certains critères suffiront à eux seuls à l'arrêt de l'expérience, telle qu'une perte de poids trop importante ou la suffocation de l'animal.

Dans ce cadre nous utiliserons un nombre de 1518 souris sur la totalité de l'étude.

14415 Nous avons montré que l'anticorps anti-CD45RC de rat était capable d'induire une tolérance à l'allogreffe de cœur chez le rat. L'anticorps anti-CD45RC humain est un candidat prometteur de thérapie active sur le système immunitaire humain notamment dans les contextes de développement d'une réaction du greffon contre l'hôte (GVH) lors de greffes hématopoïétiques et de rejet de greffe d'organe solide.

L'objet de cette saisine est d'évaluer le potentiel thérapeutique de l'anticorps chimère anti-CD45RC humain dans 2 modèles de souris humanisées développés par le laboratoire, à savoir un modèle de GVH xénogénique par injection de cellules humaines xénoréactives chez la souris humanisée, et un modèle d'allogreffe de peau humaine chez la souris NSG injectée avec des cellules humaines allogéniques.

Dans cette saisine, la règle des 3R a été suivie comme suit

- Remplacer Des études fonctionnelles ont été réalisées *in vitro* à partir de cellules humaines, les résultats sont prometteurs mais sont limités par l'absence du contexte physiologique et de la complexité du système immunitaire et ne peuvent remplacer les études *in vivo*. Il est donc nécessaire de tester l'efficacité immunorégulatrice de la molécule dans un modèle *vivo* proche de l'Homme. Une alternative solide à l'utilisation de primates en recherche préclinique est le modèle de souris dites « humanisées ».

- Réduire Le nombre d'animaux par groupe (5 groupes par modèle) est réduit à 10, nombre nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement significatifs (Log Rank test pour les courbes de survie, description des tests statistiques utilisés détaillée ci-après). Le nombre de groupes a été réfléchi de sorte à avoir les contrôles suffisants pour pouvoir conclure quant aux résultats obtenus. Le nombre total maximum d'animaux est de 100 (50 souris pour le modèle GVHD et 50 souris pour le modèle de greffe de peau).

-Raffiner Les animaux atteignant une perte de poids de 20% par rapport à leur poids initial seront euthanasiés, ainsi que les animaux montrant des signes physiques caractéristiques d'un mal être

tel qu'un changement de comportement. Durant le protocole, les animaux seront dans des cages avec enrichissement sur portoirs ventilés, 5 animaux/cage, et seront suivis tout les deux jours pour leur poids, le développement de la GVH et/ou du rejet de greffe et des prélèvements sanguins seront effectués tous les 15 jours pour valider la persistance des cellules humaines injectées chez la souris NSG. Tous les animaux traités avec la molécule et ceux des groupes contrôles seront analysés afin d'en obtenir un maximum d'information post mortem, au niveau anatomopathologique pour les lésions dans les organes dues à la réaction de GVH et dans le greffon, et par immunohistologie pour étudier la migration des cellules injectées et leurs mécanismes d'action.

Les résultats obtenus permettront de déterminer le potentiel thérapeutique de l'anticorps anti-CD45RC humain sur les réponses immunes intervenant dans des contextes de GVH et d'allogreffe, de mieux comprendre ses mécanismes d'action par les analyses anatomopathologiques des organes des souris traitées, et de déterminer son efficacité après humanisation à 80% et à 85%. L'anticorps anti-CD45RC fait l'objet d'un brevet quant à son potentiel thérapeutique prometteur dans le domaine de la transplantation d'organe solide et de cellules, et aussi pour le traitement de maladies autoimmunes. La validation de la molécule dans ce modèle préclinique de souris humanisée est la dernière étape indispensable avant les tests cliniques.

14416 Cette autorisation est demandée en vue d'utiliser des animaux, plus spécialement des souris Balb/c qui servent pour la production d'anticorps monoclonaux (immunisation et production d'ascite) à visée diagnostique ou thérapeutique.

Les anticorps monoclonaux sont utilisés pour établir un diagnostic dans le domaine de la recherche scientifique et en thérapie. Ce sont des substances immunobiologiques qui réagissent de façon hautement spécifique avec certaines structures cellulaires. Ils sont utilisés en immunologie, virologie et biochimie ainsi que dans d'autres domaines de recherche. De nombreux tests de diagnostic modernes sont basés sur ces techniques (ELISA, ELISpot). Les anticorps monoclonaux ont permis d'avancer dans certains domaines de la recherche médicale, notamment en oncologie avec la destruction sélective des cellules cancéreuses, le dépistage précoce du cancer et d'autres maladies ainsi que la possibilité de produire des immunoglobulines (sérum spécifique) à des fins thérapeutiques. Des milliers d'anticorps monoclonaux différents (dont beaucoup sont conjugués) sont proposés par diverses firmes, surtout aux USA, en Grande-Bretagne et en Hollande. En outre, de nombreux groupes de chercheurs développent leurs propres anticorps monoclonaux pour l'élucidation de questions spécifiques.

La production d'anticorps monoclonaux se déroule en plusieurs étapes

- l'immunisation de la souris contre un antigène
- son euthanasie
- la récolte des lymphocytes B sécrétant les anticorps et leur fusion avec un myélome pour les rendre immortels,
- la culture de ces cellules dans un milieu adapté pour qu'elles sécrètent l'anticorps recherché. Une des méthodes est de les injecter dans la cavité abdominale des souris où elles forment des masses tumorales et de ponctionner ensuite le liquide d'ascite qui renferme les anticorps.

Pour la phase d'immunisation nous avons besoin de 560 souris /an soit 2800 sur 5 ans.

Pour les macrophages 800 souris /an, soit 4000 sur 5 ans.

Pour la production en ascite 500 souris /an, soit 2500 sur 5 ans.

Au total 1860 souris /an, soit 9300 sur 5 ans.

Règle des 3R

-aucune des techniques actuelles ne permet de remplacer la souris pendant la phase d'immunisation.

-pour les macrophages leur remplacement est à l'étude pour ce qui concerne leur rôle dans la sécrétion de facteurs de croissance. Cela pourra être utilisé lors des clonages. Par contre nous

n'avons pas de solution pour remplacer leur rôle dans la phagocytose des débris cellulaires présents dans les plaques de fusion et ils devront toujours être utilisés.

- pour les ascites des méthodes alternatives permettent maintenant de cultiver les cellules *in vitro*, et notre partenariat avec la société RD-Biotech, qui a une unité de production *in vitro*, nous donne accès à ces techniques à un coût équivalent aux productions en ascites. Nous prévoyons une décroissance régulière du nombre de 3 productions par la méthode de l'ascite, d'ici 3 ans elle ne sera plus utilisée sauf rare exception.

L'expérience acquise depuis 28 ans nous permet d'optimiser le nombre de souris nécessaires. L'utilisation d'analgésiques et le respect des points limites nous aident à réduire la douleur infligée.

14417 Chaque année, la mortalité liée à une cause cardiovasculaire touche environ 17 millions de personnes dans le monde. Une proportion importante de ces décès est liée à un arrêt cardiaque soudain, dont l'incidence en dehors du milieu hospitalier atteint 50 à 100 individus pour 100 000 habitants dans les pays industrialisés. En France, la mortalité liée à cette affection est très importante avec environ 40.000 décès chaque année, ce qui représente la deuxième cause de mortalité après le cancer. Ces décès sont principalement liés à un arrêt cardiaque provoqué par un infarctus du myocarde sous-jacent. Dans ce cas, seulement 7% des patients survivent sans séquelle neurologique. L'objectif principal de la prise en charge initiale de l'arrêt cardiaque consiste à réanimer les patients le plus vite possible à l'aide d'un massage cardiaque. Néanmoins, chez certains patients, la reprise d'une activité cardiaque est impossible avec les soins habituels de réanimation on parle alors d'arrêt cardiaque réfractaire (ACR). Dans cette situation, il est proposé de recourir à des soins plus avancés tels que l'assistance circulatoire extra-corporelle (ACE), qui permet d'assurer une perfusion et une oxygénation des organes au cours de la réanimation. Cependant, l'impact d'une ACE sur l'autorégulation vasculaire cérébrale et sa microcirculation reste pour l'instant totalement inconnu. Ces éléments sont pourtant des déterminants essentiels de la perfusion cérébrale et de l'apparition ultérieure des séquelles neurologiques. Il est donc pertinent de les étudier spécifiquement dans différentes conditions d'ACE. L'impact d'une hypothermie thérapeutique sera également évalué, puisqu'il s'agit d'une autre approche proposée pour limiter les séquelles neurologiques.

Dans cette étude, notre objectif sera donc d'évaluer les variations de débit sanguin cérébral et de microcirculation en fonction des débits d'ACE et de pression respiratoire expiratoire positive (PEP) chez le porc soumis à un arrêt cardiaque réfractaire.

Compte tenu de la complexité de l'affection considérée et du caractère intégratif des critères étudiés, cette étude ne peut pas être mimée *in vitro* (absence de Remplacement possible). Le nombre d'animaux inclus sera réduit autant que possible, avec un total de 40 animaux, puisque nous testerons divers niveaux d'ACE ou de PEP sur chaque animal (Réduction). Chaque expérience sera valorisée au maximum au travers d'analyses complémentaires, et l'ensemble des expériences seront réalisés à l'état anesthésié et avec une administration d'antalgique, pour prévenir toute souffrance de l'animal (Raffinement).

14418 Les anticorps de lapin anti HBS sont utilisés pour la fabrication de test de diagnostic *in vitro* pour le réactif de confirmation du test de screening de la présence d'antigène du virus de l'hépatite B dans le plasma humain. Il permet de confirmer un résultat positif répétable obtenu avec le réactif VIDAS HBs Ag Ultra.

Le virus de l'hépatite B est responsable d'hépatites aiguës et chroniques. Les hépatites aiguës peuvent être asymptomatiques ou présenter des symptômes de gravité variable pouvant aller jusqu'à l'hépatite fulminante dans 0,1 à 0,5 % des cas. La chronicité survient dans 5 à 10 % des cas chez l'adulte mais jusqu'à 90 % des cas chez l'enfant lors de transmission périnatale. Actuellement, environ 350 millions de personnes dans le monde sont estimés porteurs chroniques du virus. L'hépatite B chronique peut être asymptomatique ou conduire à des lésions du foie de gravité plus ou moins importante pouvant entraîner une cirrhose puis une évolution possible, dans 5 % des cas, vers un hépatocarcinome.

Le virus de l'hépatite B peut être transmis par voie parentérale, périnatale, et sexuelle. Les personnes les plus exposées incluent le personnel de santé, les toxicomanes, les personnes à partenaires sexuels multiples, les polytransfusés ou hémodialysés, l'entourage familial d'un sujet contaminé et les nouveau-nés de mère infectée.

La détection de la présence de l'antigène HBS permet donc d'identifier une contamination par le virus de l'hépatite B et une prise en charge adéquate du sujet ainsi détecté.

Donc dans le cadre du diagnostic de l'infection par le virus de l'hépatite B, le test de recherche de l'antigène HBs dans le sérum des patients est systématiquement réalisé; En cas de résultat positif, un test de confirmation doit être réalisé pour vérifier que la positivité ne résulte pas d'une réaction interférente pour ce faire, on refait le test mais en neutralisant au préalable l'antigène HBS avec un anticorps pour bloquer la réactivité immunologique ultérieure lors de la réalisation du dosage. L'obtention d'un test négatif après cette étape de neutralisation alors que le test est positif en l'absence de neutralisation confirme la présence de l'antigène HBs dans l'échantillon.

La neutralisation complète de la réactivité immunologique de l'antigène HBs ne peut-être obtenue qu'avec un anticorps polyclonal obtenu sur animal le choix du lapin comme espèce à immuniser répond au besoin qualitatif des anticorps et permet de limiter au minimum le nombre d'animaux nécessaire pour l'obtention des quantités d'anticorps requis.

Les anticorps polyclonaux de lapins anti-P24 dirigés contre la protéine P24 du virus HIV sont utilisés depuis plus de 20 ans pour la fabrication de tests de diagnostic *in vitro* de contamination précoce par le virus HIV. La protéine p24 est généralement détectable dans le sérum d'un sujet dès deux semaines après la contamination par le VIH-1. Sa présence est le reflet d'une réplication intense du virus. Sa prescription peut permettre un diagnostic précoce chez un patient en phase de pré ou perséroconversion. Chez les enfants nés de mère séropositive pour le VIH-1, la présence de protéine p24 dans le surnageant de culture du virus dès la naissance, serait prédictive de formes précoces et sévères de la maladie.

Lors du développement des tests de diagnostic du panel VIDAS (VIDAS HIV Duo Ultra, VIDAS HIV DUO Quick et VIDAS HIVP24II), il a été trouvé que seule l'utilisation d'un anticorps polyclonal (mélange de plusieurs anticorps produits par différents clones de plasmocytes d'un animal en réponse à une infection), pouvait permettre de détecter l'ensemble des sous-types possibles de souche virale. Ce type d'anticorps ne peut être obtenu qu'après immunisation d'une espèce animale.

L'expérience acquise sur ce type d'immunisation nous permet, pour une période de 5 années, de limiter à 270 lapins le nombre d'animaux à engager dans le projet, pour obtenir les volumes d'anticorps nécessaires assurant la production des tests de diagnostic, qui seront fournis aux laboratoires d'analyses hospitaliers et privés réalisant les tests de diagnostic.

Les conditions d'hébergement des animaux sont définies pour favoriser la réduction du stress, en présence d'une ambiance musicale une surveillance de l'état général des animaux est réalisée et toute dégradation déclenche une demande de conseil auprès d'un vétérinaire.

Les prélèvements finaux de sang sont effectués sous anesthésie.

14419 Le système immunitaire nous défend contre les infections et les tumeurs. Or, son activité doit être finement contrôlée afin de prévenir le développement des immuno pathologies, provoquées par une activation exacerbée du système immunitaire, telles que les maladies auto-immunes (ex. le diabète juvénile, la sclérose en plaques, la polyarthrite rhumatoïde) ou inflammatoires chroniques (telles que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et l'asthme allergique). Le contrôle de la réponse immunitaire implique des mécanismes activateurs et inhibiteurs. Parmi les mécanismes activateurs se trouvent des processus qui modifient le type de la réponse immunitaire selon l'agression subie, par exemple des infections par des virus (le cas du SIDA), des bactéries (la tuberculose), ou encore par des parasites (le paludisme). Puisque ces mêmes types des réponses immunitaires peuvent provoquer des immunopathologies, il est important de connaître les mécanismes impliqués dans leur mise en œuvre. Normalement, ces immunopathologies sont prévenues par des sous-populations de globules blancs dits « régulateurs » avec activité

immunosuppressive. L'ensemble de ces arguments montre l'importance de la compréhension de la régulation du système immunitaire afin de mieux comprendre les déficits du système immunitaire menant à une sensibilité accrue à des infections, à des immunopathologies et au développement du cancer. Une telle compréhension permettra aussi de développer des thérapies innovantes contre un grand éventail de pathologies.

Notre laboratoire étudie les mécanismes cellulaires et moléculaires qui contrôlent la différenciation et les fonctions intra-thymiques et périphériques de la population des globules blancs qui contrôle les réponses immunitaires, les lymphocytes T. Notre projet s'articule autour d'un axe de recherche principale

Les mécanismes qui contrôlent la génération des lymphocytes T dans le thymus

Les lymphocytes T se développent dans le thymus et y peuvent déjà se différencier en cellules qui vont activer ou bien supprimer les réponses immunitaires. Des mécanismes complexes de sélection jouent un rôle très important dans le développement des lymphocytes T « activateurs » qui sont particulièrement adaptés à la défense de l'organisme contre les infections et le cancer et des lymphocytes T « supprimeurs » qui inhibent les réponses immunitaires afin de prévenir les immunopathologies. Nous avons récemment montré que, chez l'homme comme chez la souris, les lymphocytes T peuvent, après leur activation dans des réponses immunitaires, revenir dans le thymus et y modifier le développement des lymphocytes T. Notre projet vise à déterminer l'impact de ces lymphocytes T sur le développement des lymphocytes T activateurs et supprimeurs dans le thymus. Les conditions naturelles du développement des lymphocytes T dans le thymus ne peuvent pas être reproduites *in vitro*. Un nombre minimal de souris (estimé à 120 animaux maximale) sera utilisé dans cette étude, ce nombre nous permettra de tirer des conclusions définitives ce qui évitera que l'étude devra être répétée. L'utilisation de l'ecographie par un micro-chirurgien et d'autre personnel qualifié permettra un raffinement maximale de cette étude

14420 Les toxoplasmes, parasites de l'homme, sont produits dans le cadre de la présente demande d'autorisation pour être utilisés pour dans la production de différents types de kits de diagnostic de la toxoplasmose par méthode sérologique. Ces kits sont considérés comme critiques au regard de la norme IVD (*In vitro* Diagnostics) 98/79/CE. Le diagnostic de la toxoplasmose est un test obligatoire en France dans le cadre du bilan prénatal. La toxoplasmose est une affection transmissible de la mère à l'enfant qui peut entraîner des séquelles très invalidantes pour le fœtus. Il est donc primordial de savoir si la mère est protégée en début de grossesse ou sinon d'effectuer un suivi sérologique mensuel

La culture de toxoplasmes a été validée sur souris pour assurer la performance des tests de diagnostic *in vitro* et un autre mode de production de ces toxoplasmes sur une source non animale n'a pas pu être validé.

La souris est le modèle le plus adapté pour cette production. 70 000 souris (femelles) sont nécessaires sur les 5 années de durée du projet.

Les animaux entrent en production après une période d'acclimatation de 14 jours et sont hébergés sur litière sciure/copeaux assurant l'enrichissement du milieu. Un tunnel PVC est introduit dans la cage permettant aux souris de se cacher

14421 Les maladies chroniques de l'intestin (MICI) se caractérisent par une inflammation du tractus gastro-intestinal. Il existe deux pathologies la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique. Ces pathologies touchent entre cinq et six personnes sur 100 000. Elles débutent généralement chez le jeune adulte et touchent indifféremment les deux sexes. Elles évoluent par phases de poussées caractérisées par différents symptômes a : des diarrhées chroniques, hémorragiques ou non, d'importantes douleurs abdominales et des pertes de poids dues à une mauvaise absorption des nutriments. Ces poussées sont entrecoupées de phases de remissions. Ces pathologies chroniques engendrent un inconfort de vie. Les traitements disponibles aujourd'hui sont soit des traitements symptomatiques, soit reposent sur des actes chirurgicaux. L'étiologie des MICI est encore mal connue.

Les modèles animaux sont devenus essentiels pour déterminer les mécanismes physiopathologiques et les processus immunologiques à l'origine de l'inflammation chronique des muqueuses. A ce jour il existe de nombreux modèles décrits dans la littérature, tous induisent chez l'animal (avec un degré de sévérité plus ou moins important), une perte de poids, un ramollissement des fèces et diarrhée ainsi qu'une présence de sang dans les fèces. Cependant, aucun de ces modèles ne regroupent tous les critères de la pathologie humaine. Le modèle animal à considérer doit être choisi selon les aspects de la maladie humaine qu'il doit reproduire.

L'objectif de cette étude est de d'évaluer l'efficacité de nouvelles molécules thérapeutiques pour les MICI chez le rat ou la souris. Le modèle utilisé sera adapté aux cibles thérapeutiques à évaluer.

3 modèles seront développés

- le modèle induit par l'administration intracolique d'acide trinitrobenzène sulfonique (TNBS), chez le rat et la souris (aigu et chronique)
- le modèle induit oralement par le sulfate de sodium dextran (DSS), chez la souris (aigu et chronique)
- et enfin, le modèle induit par l'oxazolone, chez la souris (aiguë)

Afin de répondre à cet objectif le nombre d'animaux utilisés sera de 720 rats et 1800 souris en raison de 12 animaux par groupe (minimum nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs), le nombre de groupe étant fonction du nombre de molécules et/ou doses à tester. Le détail du nombre d'animaux sera présenté pour chaque procédure. Les tests statistiques réalisés sur les données recueillies pendant l'expérimentation et lors du sacrifice seront fonction de la normalité et de la distribution des données (tests paramétriques ou non paramétriques...). Dans le cas de la comparaison versus groupe contrôle, une One-way ANOVA (test paramétrique) ou un test de Kruskal Wallis sera réalisé (non paramétrique). Dans le cas d'une comparaison versus la valeur basale, un Two-way ANOVA avec mesures répétées (paramétrique) ou un test de Friedman (non paramétrique) seront utilisés.

Dès l'induction de la pathologie, les animaux seront suivis régulièrement au cours du temps (de 7 jours et jusqu'à 6 semaines selon le modèle) par des techniques non-invasives : suivi du poids, consistance des fèces et présence de sang dans les fèces évaluées par le test Hémocult II®. L'utilisation de ces techniques non-invasives permet d'observer au cours du temps un seul animal, là où l'information devait être obtenue par euthanasie et autopsie de multiples individus à chaque stade d'une seule étude, permettant ainsi de réduire sensiblement le nombre d'animaux. Dès leur arrivée dans la zone d'exploration fonctionnelle, les animaux seront hébergés dans des conditions définies par la directive européenne 2010/63/UE et un enrichissement adapté sera introduit dans l'hébergement des animaux afin de les stimuler (tel que des aspen bricks (morceaux de bois) ou des tunnels polycarbonate). Lors de l'anesthésie des animaux, ces derniers seront placés sur des tapis chauffants afin de maintenir leur température corporelle en condition physiologique.

Nous avons établi une stratégie d'expérimentation nous permettant dans la mesure du possible, de mesurer la valeur basale de chaque animal (l'animal est son propre contrôle). Cette stratégie permet donc de réduire sensiblement le nombre d'animaux par groupe et ainsi de réaliser ce projet selon les exigences de la règle des 3-R (remplacement, réduction et raffinement).

Ce projet incluant des procédures classées sévères subira une évaluation rétrospective par les autorités compétentes.

14422 Les néoplasmes myéloprolifératifs (NMP) sont des maladies hématologiques caractérisées par une production exagérée et incontrôlée de globules rouges, plaquettes ou globules blancs. Ils ont une évolution fatale à plus ou moins long terme et restent sans traitement spécifique curatif. Ils sont dus à une « mutation dite initiatrice », principalement la mutation « JAK2V617F », survenant au niveau d'une cellule « souche » située dans la moelle osseuse et à l'origine des cellules du sang. Les NMP s'aggravent à cause de « mutations dites additionnelles ». Notre équipe a développé une souris présentant la mutation initiatrice JAK2V617F et montré que la « souris JAK2V617F » présentait une maladie identique aux NMP humaines et répondait de façon identique aux patients à deux

médicaments, un inhibiteur de JAK2 et l'interféron, en faisant un modèle préclinique de valeur pour tester de nouvelles thérapies dans ces maladies.

Les buts de ce projet sont de

(1) tester de nouveaux médicaments dans notre modèle de « souris JAK2V617F »

(2) développer des maladies plus graves chez cette « souris JAK2V617F » en associant la mutations JAK2V617F à ces « mutations additionnelles » pour comprendre les mécanismes d'aggravation des NMP et tester des médicaments dans ces formes sévères réfractaires aux thérapies actuelles qui posent un problème de santé publique.

Nous testerons des médicaments qui pourraient synergiser leur pouvoir curatif interféron, arsenic, inhibiteur de JAK2 et hydroxyurée. Nous espérons à la fin de cette étude développer chez l'homme un nouveau traitement dans ces maladies, principalement les formes les plus évoluées. Pour cela, nous sommes certains que les modèles de NMP murins, si fidèles aux NMP humains, nous apporteront l'éclairage suffisant. Ces modèles, par leur fidélité à la situation de la maladie humaine, ont une très grande valeur ajoutée pour la compréhension de ces maladies et leur traitement.

L'utilisation d'animaux est incontournable car nous essayons de savoir si les mutations survenant dans des cellules souches hématopoïétiques miment les symptômes hématologiques observés chez les patients atteints de NMP et si ces symptômes chez l'animal peuvent être traités par des médicaments, auquel cas où on peut espérer qu'ils seront traités chez les patients souffrant des mêmes symptômes. Il s'agit donc d'analyser l'organisme dans sa globalité incluant ses paramètres hématologiques complexes et sa survie. Les analyses *in vitro* ne peuvent pas reproduire l'auto-renouvellement des cellules souches hématopoïétiques, base de la résistance et dominance clonale des cancers, et reproduise seulement la différenciation et prolifération partielles de ces cellules. Les analyses *in vitro* sur l'efficacité des médicaments ne peuvent donc qu'être partielles sur des effets limités ne prenant pas en compte la guérison des cancers. Pour ce projet de 5 ans, nous avons prévu d'avoir besoin d'au maximum 846 souris.

Il est difficile d'avoir des cohortes d'animaux identiques car la maladie évolue avec l'âge. Pour contrer cela, nous utiliserons la transplantation médullaire. En effet, la maladie est transplantable et identique à elle-même par greffe de moelle osseuse dans des souris receveuses. Ce système nous permet donc de générer de nombreux (jusqu'à 25 / donneur) animaux receveurs ayant une maladie identique au même stade d'évolution. Cette méthode de transplantation permet aussi de réduire le nombre d'animaux utilisés par rapport à l'utilisation unique d'animaux génétiquement modifiés, et aussi du fait d'obtenir de façon synchrone et bien reproductible un groupe de modèles pour les tests de pistes thérapeutiques.

Toutes les procédures seront faites sous anesthésie générale ou locale. Les modèles animaux seront suivis attentivement, avec des points limites spécifiques (comme l'hématocrite)

14423 Le myélome multiple est la deuxième maladie sanguine maligne la plus répandue dans le monde. Cette maladie est à l'origine d'une destruction osseuse et de dysfonctionnements des organes vitaux. Cette maladie représente donc un problème de santé majeur. Malgré le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques, le myélome multiple reste incurable dans la plupart des cas. L'objectif est donc de trouver de nouveaux traitements qui vont augmenter l'efficacité des traitements actuels et ainsi induire la guérison des patients à long terme. Une nouvelle voie thérapeutique est apparue au cours des cinq dernières années l'immunothérapie. Cette approche consiste à stimuler le système immunitaire autologue du patient afin de lutter contre les cellules tumorales. Basée sur l'administration d'anticorps monoclonaux, ces traitements ciblent principalement des molécules exprimées à la surface de lymphocytes tueurs. Devant les résultats spectaculaires obtenus dans le mélanome et le cancer du poumon, ces approches doivent être testées dans le myélome. Pour ce faire, comprendre et suivre le comportement des cellules immunitaires *in vivo* dans un modèle murin de myélome est donc essentiel afin de créer des stratégies thérapeutiques appropriées et innovantes. L'utilisation de l'animal est indispensable car il n'existe pas de modèle *in vitro* qui puisse remplacer parfaitement la tumeur au sein de son microenvironnement ainsi que son évolution dans un organisme vivant. De plus, l'utilisation de

l'animal est une étape essentielle avant de passer aux tests cliniques sur l'Homme. Ce projet s'intéresse dans un premier temps au suivi de la maladie chez différentes souches de souris immunocompétentes ou immuno-déprimées injectées avec des cellules cancéreuses d'origine murine ou humaine. Ces souris seront traitées avec différents anticorps monoclonaux qui vont cibler et activer les lymphocytes anticancéreux. Ces agents seront injectés, par voie intra-péritoneale (IP), seuls ou en association avec des agents chimio thérapeutiques classiques du myélome afin de déterminer le potentiel curatif de l'immunothérapie dans le myélome. Le suivi de la maladie se fera par l'analyse du taux d'anticorps circulant par le biais de prélèvements sanguins bimensuels. Cette méthode permet de limiter le stress et la souffrance encourue par l'animal vivant dans un environnement enrichi (bâtonnets de coton, granulés à disposition dans les cages), tout en générant de nombreuses informations sur l'efficacité des traitements. De plus, le suivi longitudinal obtenu grâce à cette méthode entraîne une réduction du nombre d'animaux par procédure, puisqu'il permet de ne pas sacrifier les animaux à chaque mesure. L'objectif de ce projet, nécessitant l'utilisation de 7812 animaux sur une période de 5 ans est de trouver de nouvelles solutions thérapeutiques contre le myélome et d'évaluer leur efficacité préclinique. Ce projet sera réalisé selon les exigences de la règle des 3-R (remplacement, réduction et raffinement)

1- Remplacement le recours à l'expérimentation animale dans le cadre de cette étude se fait après de nombreuses études *in vitro* dans des modèles cellulaires montrant l'importance de ces facteurs dans la physiopathologie. Le principe de remplacement n'est pas applicable à ce projet car les études *in vitro* ne reproduisent pas l'ensemble des voies impliquées dans des modèles physiologiques intégrés et par conséquent ne permettent pas l'obtention de résultats scientifiques exploitables et pertinents de la pathologie humaine.

2- Réduction les expériences sont organisées de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux. Des études préliminaires, basée sur l'injection intraveineuse de cellules tumorales, nous ont permis de maîtriser ces modèles murins permettant ainsi de réduire le nombre d'animaux. De plus, nous avons déjà validé certaines de nos approches expérimentales *in vitro* permettant d'optimiser l'utilisation des animaux. Les résultats actuels ont permis de valider que des lots de 5 à 10 souris permettent d'acquérir des données fiables. Les rongeurs utilisés sont consanguins et de mêmes âge réduisant la variabilité entre les animaux et donc le nombre nécessaire pour obtenir des résultats fiables.

3- Raffinement Le bien-être de l'animal, outre les considérations éthiques, est aussi un facteur de variabilité expérimentale, qui est pris en compte et réduit grâce au suivi rapproché quotidien des animaux, l'enrichissement de leur environnement (coton afin qu'ils puissent faire un nid) et le respect de l'aspect social du groupe (pas d'isolement ni de changement de cage). De plus, une période d'acclimatation d'une semaine sera respectée avant l'expérimentation. En cas de douleurs de l'animal nous utiliserons des analgésiques adaptés; nous avons aussi fixé des points limites et des critères d'arrêt de l'expérimentation afin de limiter la souffrance.

14424 Contexte de la recherche L'ostéoradionécrose mandibulaire (ORM) est une complication qui apparaît dans les 6 mois à 5 ans chez 5 à 10% des patients ayant bénéficié d'une radiothérapie pour un cancer de la cavité buccale ou de l'oropharynx. Cette nécrose entraîne des douleurs majeures, des difficultés voire impossibilité d'alimentation par voie orale. Si, à l'heure actuelle, des traitements conservateurs existent pour des plages d'ORM inférieures à 2 cm, il n'existe pas de solution conservatrice efficace pour des ORM plus étendues. Le traitement de ces dernières nécessite des chirurgies lourdes avec ou sans reconstruction.

Le but de ce projet est de développer de nouveaux matériaux composites poreux permettant une néoformation osseuse dans le but de proposer une solution pour traiter les ORM étendues (> 1-2 cm). Ces matériaux sont développés dans le cadre d'une thèse de science de 3 ans dont le but est de tester les propriétés de régénération osseuse des biomatériaux dans une étude préliminaire chez l'animal.

Le bénéfice attendu de ces nouveaux biomatériaux sont l'aide à la néo formation osseuse.

Cette étude sera effectuée sur 20 rats mâles adultes de 400 g environ et matures sexuellement, divisés en 2 groupes afin de pouvoir étudier deux durées d'implantation (6 semaines et 12 semaines) dans l'os du crâne chez le rat.

La procédure chirurgicale d'implantation peut entraîner des risques anesthésiques et des risques infection. La surveillance des animaux sera assurée quotidiennement avec l'établissement de points limites détaillés dans le raffinement.

Application des 3R

Les règles régissant le bien-être animal seront respectées.

Remplacement Les tests *in vitro* du matériau ont montré des résultats prometteurs, les tests de compatibilité et d'intégration ne peuvent être faits que sur l'animal avant une implantation chez l'homme. Le choix de l'espèce se porte sur le rat pour son faible coût, sa résistance, sa facilité d'entretien et sa taille qui permettent une chirurgie dans de bonnes conditions.

Réduction Le nombre d'animaux choisi est basé sur un test statistique (plan de Fleming) permettant d'utiliser le plus faible nombre d'animaux en ayant des résultats valides. Deux groupes de 10 rats seront constitués de façon aléatoire. La chirurgie comprendra deux trépanations, une qui sera comblée par le biomatériau et une seconde qui servira de témoin. Cela permet de ne pas avoir besoin d'un groupe de rat témoin, chaque animal étant son propre témoin. Le modèle animal d'implantologie crânienne chez le rat est décrit dans la littérature.

Raffinement Dans le cadre du respect du bien-être animal, les cages seront conformes à la réglementation et les rats seront deux par cage, afin de respecter le besoin d'interaction sociale de cette espèce tout en limitant le risque de bagarre, d'arrachage des points et d'ouverture des plaies. Les cages utilisées seront des cages ventilées dans des pièces permettant de contrôler la pression, la température et l'humidité. Les rythmes horaires (nuit/jour) seront également respectés et les cages changées deux fois par semaine. Un enrichissement des compartiments sera réalisé en ajoutant des cachettes, du papier et du coton afin de permettre la nidification. Avant toute procédure, une période d'acclimatation de deux semaines sera respectée à la réception des animaux et ils seront manipulés plusieurs fois avant l'opération afin de les habituer aux manipulateurs. L'intervention chirurgicale sera effectuée sous anesthésie générale (profondeur de l'anesthésie vérifiée par absence de réflexe au pincement des pattes). Une analgésie sera mise en place pendant la chirurgie et en post-opératoire sur 5 jours afin de limiter la douleur. L'état général des animaux implantés sera surveillé de près pendant les 5 jours suivant l'implantation. Des points limites précoces permettront d'assurer la bonne conduite de l'étude comme une perte de poids supérieure à 20%, exposition de l'implant, défaut de cicatrisation supérieur à 50%, écoulement oculaire, léthargie, posture cambrée, ataxie ou autre difficulté de déplacement ou de comportement comme le toilettage. Dans le cas d'apparition d'un de ces symptômes l'animal sera euthanasié par surdosage de Dolethal par voie intracardiaque sous anesthésie.

Enjeux en matière de santé publique Cette étude préliminaire est une première étape nécessaire dans l'utilisation de biomatériaux composites poreux pour le traitement de l'ostéoradionécrose mandibulaire. Ces matériaux permettent de proposer une solution sous forme d'implant peu invasif et de forme adaptable au défaut osseux lié à cette pathologie et, en cas de succès, pourront être transposés à l'homme lors d'essais cliniques.

14425 La dépression, les troubles de la mémoire et le diabète de type 2 (DT2), caractérisé par une résistance de l'organisme à l'insuline, font partie des maladies ayant un fort impact sur la santé publique dans le monde. De nombreuses études épidémiologiques montrent que ces deux pathologies sont étroitement liées. Néanmoins, les mécanismes sous-tendant le développement de ces deux pathologies restent peu connus et nécessitent une attention particulière. Au niveau cérébral, l'inflammation chronique est d'une part, une conséquence associée au DT2 et d'autre part, impliquée dans le développement des troubles de l'humeur.

Le milieu marin constitue la plus grande partie de la biosphère et contient les formes les plus anciennes et variées de la vie. Cette diversité de vie et d'environnements atypiques ouvrent des perspectives pour le développement de nouvelles molécules bio-actives. Les organismes marins,

et notamment les algues marines possèdent un immense potentiel de molécules originales d'intérêt biologique. Ainsi, les extraits d'algues, qui contiennent des molécules aux potentiels bioactifs métaboliques (insulino-sensibilisateur), anti-inflammatoires et anti-oxydants, représentent une stratégie nouvelle pour la prise en charge ou la prévention de ces troubles et une alternative à l'utilisation de médicaments anti-inflammatoires classiques qui ont des effets secondaires multiples qui limitent leur utilisation. Cependant, aucune approche n'a encore été mise en oeuvre pour étudier le potentiel d'un mélange d'actifs algosourcés consommés par des personnes souffrant de troubles comme la dépression associée au DT2. Dans ce contexte, ce projet propose de tester des actifs algo-sourcés assimilables au niveau intestinal, ciblant l'inflammation et l'insulino-résistance dans le but d'améliorer les troubles de l'humeur et de la mémoire liés au diabète.

Pour cela, des animaux nourris avec une diète obésogène et diabétogène enrichie en gras et en sucre recevront dans l'eau de boisson un extrait d'algue verte (*Ulva* sp.) pendant 4 ou 16 semaines avant de subir des tests comportementaux permettant d'apprécier leur état émotionnel, mnésique et métabolique. Nous déterminerons ainsi si la supplémentation d'animaux avec un tel extrait d'algue permet de d'améliorer les troubles métaboliques, émotionnels et mnésiques induits par l'alimentation enrichie en gras et en sucre.

Ce projet nécessitera l'utilisation de 1680 souris mâles et femelles adultes sur une durée de 5 ans. L'étude de comportements anxiodépressifs ne peut être réalisée que sur animaux vivants ce qui rend impossible le remplacement de ceux-ci par des modèles *in vitro*. Le nombre d'animaux sera réduit au mieux grâce à l'utilisation de tests statistiques montrant la différence entre plusieurs groupes. Toutes les précautions possibles seront prises afin de raffiner nos procédures et réduire au mieux l'inconfort des animaux (manipulation régulière et enrichissement de l'hébergement). Aucune manipulation n'induera de la douleur aux animaux.

14426 La digestion, la glycémie, et l'appétit sont régulés par différentes hormones (telles que l'insuline pancréatique), produites par les cellules endocrines présentes dans le pancréas et l'intestin. Des pathologies sévères telles que diabète, obésité et malabsorption intestinale sont associées à des altérations des cellules endocrines. Notre laboratoire s'intéresse aux mécanismes responsables du développement des cellules endocrines pancréatiques et intestinales, afin de comprendre comment ces cellules très hétérogènes sont produites, en particulier dans l'intestin (où elles sont appelées cellules entéroendocrines (CEE), et comment elles sont capables d'assurer leurs fonctions tout au long de la vie. Malgré leur grande diversité, les cellules endocrines sont toutes issues de cellules dites progénitrices qui expriment un gène spécifique commun. L'absence d'expression de ce gène dans l'intestin au cours du développement entraîne une perte de l'ensemble des CEE et par conséquent de toutes les hormones qu'elles produisent, provoquant une malabsorption intestinale et des diarrhées chroniques. Ces altérations engendrent des atteintes très sévères chez l'Homme et entraînent une létalité périnatale dans des modèles murins, empêchant l'étude à des stades tardifs, lorsque l'intestin est pleinement fonctionnel. Les cellules de l'épithélium intestinal, y compris les CEE, sont continuellement renouvelées (tous les 3-4 jours chez l'Homme) durant toute l'existence. Afin d'étudier le rôle des CEE et des hormones intestinales dans l'intestin mature au cours de ces processus et d'éviter la létalité périnatale, nous avons développé un modèle de souris où l'on peut induire, suite à l'administration d'une drogue (le tamoxifène), l'inactivation du gène responsable de la formation des CEE dans l'intestin. Dans ce projet, nous souhaitons induire l'inactivation de ce gène chez l'adulte afin de définir l'impact de la perte des CEE sur le métabolisme énergétique (en particulier la régulation de la glycémie) et l'absorption des nutriments, et de suivre les éventuelles conséquences sur la flore intestinale. Nous souhaitons également évaluer le rôle de l'alimentation sur le développement des CEE. Dans ce but, l'ensemble des analyses (métabolisme, flore intestinale) sera réalisé à la fois en présence d'une alimentation standard et d'une alimentation riche en graisses.

Remplacement Ces analyses liées à la physiologie étudient le métabolisme et les interactions avec l'environnement (communications inter-organes, réponses aux stimuli microbiens et alimentaires...) et ne peuvent être réalisées qu'*in vivo*. Pour analyser plus finement les mécanismes à l'échelle cellulaire dans un environnement défini, nous souhaitons également générer des organoïdes

intestinaux *in vitro* à partir de la lignée de souris décrite ci-dessus, où l'expression du gène d'intérêt aura été préalablement abolie chez l'adulte par traitement au tamoxifène. Les organoïdes intestinaux correspondent à des "mini-intestins" qui ne comportent que l'épithélium intestinal, incluant les CEE. Ce système simplifié présente différents avantages : les organoïdes peuvent être amplifiés et maintenus en culture à long terme dans un environnement défini, qui peut être modifié aisément (par addition de substances d'intérêt dans le milieu de culture); ils peuvent également être modifiés génétiquement sans avoir recours à l'animal. L'établissement d'un tel modèle permettra de réaliser des analyses à l'échelle cellulaire et moléculaire, pouvant être répétées *in vitro* de manière à atteindre une puissance statistique suffisante, et permettra ainsi de réduire le nombre d'animaux utilisés.

Dans ce projet (établi pour une période de 5 ans), nous utiliserons 80 souris pour les études métaboliques *in vivo*, ce qui correspond à 10 animaux par lot, incluant un lot contrôle et un lot mutant, les 2 types d'alimentation (standard et riche en graisses), et des lots de mâles et de femelles pour tenir compte d'éventuelles différences liées au sexe.

Pour générer les organoïdes intestinaux, nous utiliserons 20 souris (incluant 5 animaux par lot, contrôles/mutants et mâles/femelles), les analyses étant ensuite majoritairement poursuivies *in vitro* dans un environnement défini. Nous utiliserons ainsi un total de 100 souris.

Raffinement la majorité des expérimentations de ce projet sera réalisée sur des plateformes dédiées par un personnel compétent effectuant couramment les différentes procédures et respectant l'ensemble des règles relatives au bien-être animal, limitant ainsi au maximum le stress de l'animal. Par ailleurs, les souris seront maintenues le plus souvent dans leur environnement habituel, excepté lors des analyses du métabolisme énergétique qui nécessitent leur isolement dans des cages métaboliques qui ne comportent pas de litière. Dans ce cas, une période d'adaptation de 3 jours sera respectée et dès la fin des prélèvements les souris seront replacées dans des cages classiques (incluant litière et enrichissement). En outre, des phases de repos de 15 jours seront respectées entre les différents tests métaboliques. Les procédures mises en oeuvre impliquent un suivi régulier, notamment une pesée hebdomadaire; en cas de souffrance d'un animal, l'avis du vétérinaire sera demandé.

Réduction Le nombre de souris utilisées dans cette étude a été calculé en tenant compte notamment de la variabilité inter-individus (élevée dans le cas de tests métaboliques) mais également pour l'application de tests statistiques adéquats (tels que t-test ou test non paramétrique de Mann Whitney).

14427 Les maladies mentales et neurologiques constituent un réel problème de santé publique puisqu'elles sont la première cause d'invalidité dans le monde. Parmi ces maladies, la schizophrénie touche 1% de la population. Les symptômes associés à cette maladie sont très variés et apparaissent à la fin de l'adolescence ou chez le jeune adulte. Les patients présentent aussi des déficits cognitifs (concentration, attention, mémoire de travail...) qui apparaissent dans l'enfance et auraient pour origine des défauts neurodéveloppementaux. Les traitements, qui restent pour l'heure purement symptomatiques, sont la plupart du temps peu efficaces. Il est donc crucial de comprendre l'origine de cette maladie, pour pouvoir ouvrir de nouvelles voies thérapeutiques.

Les synapses, connexions permettant aux neurones de communiquer entre eux, sont indispensables au bon fonctionnement du cerveau. Aujourd'hui, il est très bien établi que des déficits de connectivité neuronale sont présents dans le cortex chez des patients atteints de schizophrénie. En revanche, en dépit de la présence évidente de déficits cérébelleux chez certains patients schizophrènes, l'implication du cervelet dans cette pathologie reste très mal étudiée. Le cervelet, très bien connu pour son rôle dans le contrôle de la motricité, et plus récemment pour son implication dans des processus cognitifs, est donc notre système d'étude. Plus précisément, nous nous intéressons aux synapses formées entre la région de l'olive inférieure et le cervelet (réseau olivo-cérébelleux).

Le modèle utilisé dans notre projet sera la souris. En effet, la souris est devenue un modèle de choix pour l'étude des mécanismes moléculaires régulant les grandes fonctions biologiques. Elle

permet l'analyse *in vivo* de ces mécanismes et des conséquences de leurs perturbations à différents niveaux comportemental, physiologique et moléculaire. Elle permet également de créer des modèles d'étude des pathologies humaines. Il existe actuellement plusieurs modèles de souris pour la schizophrénie dont un modèle pharmacologique, la souris PCP (Phencyclidine). Le but de notre projet est de déterminer si les caractéristiques fonctionnelles des synapses du réseau olivo-cérébelleux sont altérées dans ces souris PCP. Ce projet permettra ainsi d'apporter d'importants éléments à la compréhension des déficits cérébelleux liés à la schizophrénie.

Dans notre projet, nous prévoyons l'utilisation de 168 souris sur 5 ans. La règle des trois R [1) Réduction, 2) Raffinement, 3) Remplacement] est appliquée dans la mesure où 1) le projet est conçu pour limiter le nombre de souris au minimum dans la limite de ce qui est permis pour obtenir des résultats scientifiquement valides, en prenant en compte la nécessité d'avoir plusieurs échantillons et de reproduire les résultats de manière indépendante pour éviter les différences dues à la variabilité biologique (sexe, caractéristiques génétiques...). Afin de déterminer si les données quantitatives obtenues suivent une loi normale nous réaliserons un test d'Agostino-Pearson. Si la distribution des données est normale pour chaque groupe, une analyse de variance sera réalisée, suivie de tests post-hoc le cas échéant. Dans le cas où les échantillons ne suivent pas une loi normale, des tests non paramétriques seront utilisés (Mann Whitney). 2) 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 durable que pourraient ressentir les animaux. Notamment, les injections intra-péritonéales chez le souriceau seront réalisées avec les aiguilles les plus fines possibles (29G) afin de minimiser la douleur. Lors de ces injections, les souriceaux sont séparés en deux groupes, l'un reste avec la mère pendant que l'autre est injecté, afin de minimiser le stress de la mère et des bébés. Tout signe de stress ou de douleur impliquera une élimination de la procédure expérimentale. 3) Certaines études fonctionnelles ne peuvent pas être réalisées chez les patients atteints de schizophrénie. De plus, il est important d'étudier le réseau olivo-cérébelleux dans le contexte du cerveau puisque le cervelet est connecté à d'autres régions du cerveau dont le cortex qui est déjà connu pour son implication dans la schizophrénie. Une telle étude ne serait donc pas possible en culture cellulaire et nécessite d'avoir recourt à des animaux vivants.

14428 Le diabète se traduit par une élévation de la glycémie pouvant entraîner des complications d'ordres vasculaires et nerveuses. En effet, dans ce type de pathologie on peut parler d'artériopathie et de neuropathie. L'association de ces complications créer un contexte favorable de l'altération de la microcirculation. Bien plus encore, un contexte de lésion au niveau des pieds est favorable. Cela va entraîner un ulcère du pied diabétique (cicatrisation chronique altérée) qui va nécroser. Cela représente la première cause d'amputation du membre inférieur. Enfin, à l'échelle mondiale, tout cela représente des coûts très importants. La cicatrisation des plaies diabétiques met en jeu des mécanismes cellulaires complexes fibroblastes, cellules endothéliales, ré-épithélialisation, angiogénèse et inflammation chronique. L'oxygénation tissulaire est un marqueur de perfusion microvasculaire locale et joue aussi un rôle clé dans la cicatrisation.

Le syndrome d'apnées du sommeil (SAS) est une pathologie multifactorielle caractérisée par la présence d'épisodes d'hypoxie intermittente (HI) nocturne. Le SAS est aussi la cause de somnolence quotidienne, de dépression et de réveils nocturnes. Le SAS est associé à de nombreuses pathologies cardiovasculaires telles que l'hypertension artérielle systémique, l'insuffisance coronarienne, les accidents vasculaires cérébraux, l'athérosclérose mais aussi à des troubles métaboliques, notamment une insulino-résistance cardiaque spécifique et systémique ainsi que le diabète de type 2. L'atteinte microcirculatoire et le défaut de perfusion tissulaire qui en découle pourrait être un socle commun à ces complications. Plus spécifiquement dans le diabète de type 2, la fréquence du SAS est très élevée, estimée entre 58 et 86%.

L'objectif de ce projet est d'observer l'impact de l'hypoxie intermittente (modèle se rapprochant de la physiopathologie du SAS) sur la cicatrisation d'ulcères sur des modèles murins diabétiques. Nous émettons l'hypothèse que des souris diabétiques exposées à l'hypoxie intermittente présentent également un retard de cicatrisation et peut-être même plus importants que des souris diabétiques

non-exposées à l'hypoxie intermittente. En plus de visualiser si l'hypoxie intermittente apporte un retard de cicatrisation plus important chez ces souris, il s'agit aussi de regarder d'une manière un peu plus générale, son impact sur la formation de l'ulcère et sur les molécules responsables de la cicatrisation (cytokines, chémokines pré/pro inflammatoires et angiogénèse).

Durant cette première partie de l'étude nous utiliserons 402 souris (souches STZ et db/db) afin de visualiser la cicatrisation sur 2 modèles d'ulcères un ischémique (représentatif des escarres) et un par une excision (blessure plus conventionnelle). Ce nombre a été calculé en respect des règles d'éthiques en expérimentation animale limitant le nombre et l'impact du protocole sur chaque animal suivant la règle des 3R Réduire calcul du nombre minimal d'animaux nécessaires pour conclure statistiquement sur les résultats, Raffiner utilisation d'antalgiques pour la réalisation des ischémies, d'un tapis chauffant pour la thermorégulation des animaux pendant l'anesthésie et hébergement dans les conditions réglementaires, Remplacer nous ne pouvons remplacer l'animal par un modèle informatique ou cellulaire du à l'importance des interactions systémiques en jeu dans la cicatrisation. Les animaux seront exposés à un stimulus hypoxique (ou normoxique pour les groupes contrôles) tout au long de la cicatrisation des ulcères. Nous espérons, par cette étude, déterminer l'intérêt d'un traitement possible par Pression Positive Continue (PPC), traitement de référence du SAS, de patients diabétiques dans le but d'améliorer aussi la cicatrisation d'un ulcère. Procédures utilisées toutes.

14429 Les chimiothérapies utilisées pour traiter les cancers de l'ovaire sont d'une efficacité limitée en raison de la résistance à la chimiothérapie. Il existe donc un réel besoin dans la mise en œuvre de traitements efficaces et dans la sélection des patientes qui pourraient en bénéficier.

Il est donc primordial de s'appuyer sur des modèles expérimentaux tels que xénogreffes de tumeurs dérivées de patientes (patient-derived xenografts (PDX) et les organoïdes tumoraux qui reflètent de façon pertinente la pathologie.

Les PDX sont mises en place à partir de fragments de tumeurs de patientes obtenus lors de l'exérèse de la tumeur ou suite à une biopsie tumorale et implantés chez la souris immunodéprimée, puis maintenus *in vivo* par passage successifs de souris en souris. Ces modèles conservent les caractéristiques morphologiques, moléculaires et une hétérogénéité tumorale proches de celles de la tumeur d'origine du patient.

L'émergence des cultures d'organoïdes tumoraux ces dernières années a permis d'élargir le répertoire des modèles tumoraux précliniques disponibles. Ces modèles multicellulaires tridimensionnels sont obtenus *in vitro* après inclusion des cellules issues de la tumeur dans une matrice extracellulaire et cultivées dans un milieu contenant un ensemble de facteurs de croissance essentiels aux cellules souches. Ces organoïdes présentent les avantages d'avoir un potentiel illimité de croissance, un fort taux de succès d'établissement, et d'être très proches morphologiquement et génétiquement de la tumeur dont ils dérivent.

Le projet présenté ici vise à comparer la réponse à la chimiothérapie de modèles de PDX et d'organoïdes tumoraux issus de la même tumeur de patiente à la réponse clinique de la patiente dont ils sont issus afin de déterminer leur pertinence. Nous espérons ainsi pouvoir démontrer l'intérêt des organoïdes tumoraux pour prédire la réponse clinique et ainsi permettre à terme de diminuer le nombre d'animaux utilisés dans l'évaluation de nouvelles stratégies thérapeutiques (Réduction du principe de la loi des 3R).

Le nombre d'animaux maximum nécessaires pour mener à bien ce projet est de 280 sur 5 ans.

Un soin particulier a été porté au respect du principe de la loi des 3R, notamment par l'utilisation d'un minimum optimal d'animaux utilisés pour satisfaire aux exigences statistiques et répondre à l'objectif du projet (Réduction) et par l'utilisation de méthodes limitant la souffrance des animaux (Raffinement).

Ainsi, les protocoles de traitement seront menés avant que la taille totale des tumeurs ne puisse gêner le bien-être des animaux. D'autre part, une souffrance visible liée au développement tumoral sera considérée comme point limite, de même qu'une détresse caractérisée par une perte de poids supérieure à 15% ou une prostration de l'animal. Ces point limites donneront lieu à l'euthanasie de

ces animaux au système immunitaire déficient (prérequis indispensable à l'implantation de cellules tumorales d'origine humaine). Cette euthanasie sera réalisée sur des animaux préalablement anesthésiés.

14430 Le syndrome de congestion pelvienne (SCP) chez la femme est une cause fréquente de douleurs pelviennes chroniques, variables en intensité mais parfois très invalidantes, exacerbées en position debout, en fin de journée, et par les activités qui augmentent la pression abdominale. Cette symptomatologie est provoquée par une incompétence veineuse, d'origine congénitale ou acquise, caractérisée par une altération des valvules des veines pelviennes (petits clapets qui empêchent le sang de redescendre) qui drainent les organes pelviens (notamment l'utérus et les ovaires) et la paroi pelvienne. Lorsque ces valvules ne sont plus étanches, le sang reflue vers le bas induisant une stase sanguine puis une dilatation des veines pelviennes qui forment des varices potentiellement symptomatiques. Dans cette pathologie des manifestations urinaires ont également été rapportées, notamment une irritabilité vésicale associée à une augmentation de la fréquence urinaire.

Du fait de la symptomatologie variée et commune à plusieurs pathologies (i.e. endométriose, cystite interstitielle), la consultation de différents spécialistes (i.e. gynécologues, phlébologues, urologues), un défaut de connaissance du corps médical et la réticence des patientes à aborder ce sujet, cette pathologie reste sous-estimée. Néanmoins, il est désormais établi que les patientes sont majoritairement âgées de 20 à 45 ans et sont multipares. Le diagnostic exige la présence d'une douleur chronique depuis plus de 6 mois et l'existence de varices pelviennes symptomatiques. La réalisation d'une phlébographie permet de dresser une cartographie pelvienne pour proposer une stratégie thérapeutique visant essentiellement la douleur et la maladie variqueuse veineuse. Ainsi, le traitement débute par la prise d'anti-inflammatoires non stéroïdiens ou de phlébotoniques. Toutefois, ces traitements pharmacologiques montrent chez certaines patientes des limites d'efficacité, il faut alors envisager une intervention chirurgicale pour empêcher l'accumulation de sang dans les varices par embolisation ou sclérothérapie. Dans ce contexte, il est nécessaire de conduire une recherche préclinique visant à mettre en évidence et/ou à développer des traitements pharmacologiques efficaces des symptômes du SCP. Il n'existe à ce jour aucun modèle *in vitro* (remplacement) permettant l'aboutissement de cette démarche, rendant ainsi indispensable l'utilisation d'un modèle intégré faisant appel à des animaux vivants. À ce titre, la rate avec des ligatures veineuses au niveau pelvien, a été décrite dans la littérature comme un modèle préclinique de choix. Des études préalables ont d'ailleurs montré, une augmentation de la fréquence urinaire chez ces animaux, mimant un des symptômes de la pathologie humaine. Du fait des connaissances du modèle, des procédures liées au projet et de l'expérience du personnel y participant, il est possible de réduire au minimum (réduction) le nombre d'animaux inclus par groupe de traitement à n=12 pour réaliser des statistiques acceptables, soit un nombre total de n=480 animaux pour l'intégralité du projet sur 5 ans. Les rates seront hébergées par 2 dès que possible, afin de favoriser leur interaction sociale et réduire leur stress et un enrichissement adapté à leur espèce sera mis en place systématiquement (raffinement). De plus, des protocoles d'anesthésie et d'antalgie adaptés à la sévérité des procédures expérimentales seront suivis assidûment. Enfin, un suivi systématique de l'état général et du poids des animaux sera réalisé, pour une action rapide en cas d'état de souffrance de l'animal.

14431 L'objectif principal de notre plateforme est de développer de nouveaux traitements contre le cancer. Nous disposons de différents vecteurs (Anticorps, affinites, liposomes, etc...) et de plusieurs radioéléments (Astate 211, Iode 131, zirconium, Yttrium 90 Scandium 47, cuivre 64 etc...), certains connus qui servent de références et des nouveaux, produits en particulier par le cyclotron Arronax. 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. 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. Plusieurs types de modèles seront utilisés par injection de cellules tumorales chez la souris en orthotopique, c'est-à-dire dans l'organe dont la cellule tumorale est issue (cellule tumorale de prostate dans la prostate, cellule tumorale de sein dans le tissu mammaire, cellule de tumeur cérébrale dans le cerveau, cellule de tumeur colique dans le caecum.). Ces procédures permettent de réaliser des tests d'efficacité dans un modèle animal complexe, proche de la pathologie humaine dans le sens où la tumeur se développe dans un micro-environnement semblable à celui dont la lignée cellulaire est issue. Nous réalisons des images de ces souris par différentes méthodes (bioluminescence, PET-Scan, PET-IRM) avant et après les radio-immunothérapies vectorisées qui nous permettent de mesurer l'efficacité du traitement et sa toxicité sur les tissus sains.

Selon notre historique, nous estimons mener 5 études par an, soit 25 études sur 5 ans. Sachant que 30 à 70 animaux sont utilisés par étude, nous estimons que 1750 souris seront utilisées au maximum sur 5 ans. En tant que plateforme, nous réalisons des prestations de services. Par conséquent, nous sommes amenés à travailler sur différentes souches de souris, mais dont le phénotype ne sera pas dommageable.

Nos études seront planifiées pour respecter au mieux la règle des 3R pour Remplacer la pathologie cancéreuse étant une pathologie complexe, il n'existe pas à ce jour de méthodes alternatives à l'expérimentation animale. Toutefois, les principes actifs seront préalablement testés *in vitro* afin de réduire le nombre de candidats à tester *in vivo* en excluant les candidats les moins prometteurs. Réduire pour chaque étude, le nombre d'animaux utilisés est réduit à un minimum acceptable pour l'obtention d'informations robustes et statistiquement pertinentes. Raffiner l'apport de l'imagerie permet d'une part de raffiner les modèles animaux existants et d'autre part de développer et proposer des modèles *in vivo* toujours plus proches des situations cliniques. Les animaux seront hébergés selon la réglementation en vigueur avec un enrichissement du milieu. L'état général et clinique des animaux sera surveillé de façon quotidienne pour estimer une éventuelle gêne ou douleur. L'évaluation journalière permettra la mise en place et l'ajustement de traitements analgésiques.

14432 Le syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAOS), touchant jusqu'à plus de 20-25% de la population adulte, est caractérisé par une fermeture cyclique des voies aériennes pendant le sommeil. Ces pauses respiratoires engendrent une hypoxie intermittente qui constitue un problème important de santé publique car elle est fréquemment associée à une fatigue diurne, une perte de productivité au travail, une survenue plus fréquente d'accidents et des atteintes cardiovasculaires dont les accidents vasculaires cérébraux (AVC), conduisant in fine à une mortalité élevée.

Inversement, la prévalence de SAOS chez les patients post-AVC est élevée (jusqu'à 30%), et la présence de SAOS pourrait aggraver les dysfonctions cognitives post-AVC, notamment en favorisant l'inflammation et le stress oxydant et en altérant l'angiogenèse. Ainsi, le diagnostic et le traitement du SAOS post-AVC semblent essentiels pour l'amélioration de la condition des patients.

Notre projet vise à étudier, chez l'animal, l'impact de la présence d'une hypoxie intermittente (mimant le SAOS) sur la récupération post-AVC. De plus, nous investiguerons les mécanismes qui sous-tendent les effets délétères du SAOS, dans l'objectif de proposer de nouvelles pistes thérapeutiques reposant sur leur inhibition, qui pourraient donc améliorer la récupération post-AVC.

Notre projet prend en compte la règle des 3R

Les mécanismes délétères perturbant la récupération post-SAOS ne peuvent que partiellement être étudiés *in vivo* chez l'Homme : en effet, si un suivi par imagerie et un suivi fonctionnel peuvent être faits, il n'est pas possible d'accéder aux mécanismes à l'échelle cellulaire. La compréhension de ces mécanismes et la proposition de nouvelles pistes thérapeutiques requièrent donc une approche intégrée. Aucune méthode alternative (notamment en culture cellulaire) ne peut se substituer à l'utilisation des animaux dans ce cadre, car les modèles cellulaires sont trop restreints : il n'existe

ainsi pas de modèle combinant vaisseaux, neurones et cellules gliales, permettant de mimer une ischémie puis une reperfusion.

Le nombre de rats nécessaire à nos travaux a été réduit au minimum sans compromettre l'interprétation statistique de nos résultats 15 animaux par groupe au final sont prévus, pour un total de 1860 rats sur 5 ans. De plus, nous commencerons ce projet par un groupe préliminaire qui permettra l'identification de pistes mécanistiques pour la suite du projet et la mise au point du protocole si cette étude préliminaire révèle que le nombre de rats par groupe est surévalué, nous le réduirons de façon à atteindre un nombre d'animaux nécessaire et suffisant et non excessif.

Les rats seront suivis avec un soin particulier avec des points limites clairement définis, afin de détecter et prendre en charge précocement tout signe de souffrance.

14433 La médecine nucléaire est une spécialité médicale reposant sur l'utilisation de molécules marquées avec des radioisotopes. Elles peuvent être employées dans le cadre de pathologies diverses affectant différents organes. Dans le domaine de la cancérologie, la médecine nucléaire peut être employée à des fins d'imagerie ou de thérapie. En effet, l'administration d'une molécule couplée à un radioélément émettant des photons ou des positrons permet de visualiser la répartition de ce composé dans l'organisme (c.à.d. sa biodistribution) et en particulier son accumulation dans les tumeurs. Ceci est réalisé grâce à des caméras dédiées qui permettent de détecter de manière non invasive les photons émis lors des désintégrations radioactives. Par ailleurs, il est également possible d'administrer une molécule couplée avec un radioélément émetteur de particules beta moins ou de particules alpha, qui ont la propriété de détruire les cellules tumorales ciblées. Que l'objectif final soit de réaliser de l'imagerie ou de la thérapie, ces molécules couplées à des isotopes radioactifs sont également dénommées radiotraceurs. L'objectif de ce projet est d'évaluer chez la souris la biodistribution et/ou l'efficacité de nouveaux radiotraceurs dans le domaine de l'oncologie. La biodistribution des composés sera évaluée chez des souris, immunocompétentes ou immunodéficientes, chez lesquelles pourra avoir été implantée en sous-cutanée au niveau du flanc une lignée de cellules tumorales. L'étude de la biodistribution du radiotraceur sera réalisée à différents temps suivant son administration. L'efficacité thérapeutique sera elle évaluée sur des souris, immunocompétentes ou immunodéficientes, mais toujours porteuses de tumeurs implantées en sous-cutanée. L'efficacité sera évaluée par suivi au cours du temps du volume tumoral. Tout sera mis en œuvre lors de cette étude pour respecter la règle des 3R (Remplacer, Réduire et Raffiner) Les animaux seront hébergés en groupe avec enrichissement du milieu de vie des points limites adaptés, tel qu'un volume tumoral maximal, seront utilisés afin de réduire le stress et la souffrance un suivi quotidien de leur bien-être sera réalisé lors des procédures d'imagerie les animaux seront anesthésiés, leur température contrôlée, et un gel ophtalmique sera utilisé pour prévenir toute sécheresse oculaire enfin, le nombre minimum de mesures et d'animaux permettant le recueil de données statistiquement exploitables sera utilisé. Au maximum 200 animaux/an, soit 1000 sur 5 ans seront inclus dans ces études.

14434 Le cancer de la prostate (CaP) est le plus fréquent des cancers masculins en France. C'est une pathologie complexe dont les facteurs pronostiques actuellement disponibles ne permettent pas de prédire avec précision l'évolution de ce cancer vers la résistance aux traitements. Par ailleurs, malgré l'émergence de plusieurs médicaments, ces derniers restent des traitements palliatifs et non curatifs.

Actuellement, de nombreuses études visent à utiliser des bactéries lactiques capables d'exercer des effets bénéfiques sur la santé de l'hôte lorsqu'elles sont administrées en quantité adéquate (bactéries à propriétés probiotiques). Ces bactéries sont présentes naturellement dans différents organes chez l'homme et les animaux. La littérature scientifique reporte des propriétés thérapeutiques potentielles anti-inflammatoires et anti-cancéreuses pour certaines souches de lactobacilles. En effet, certains lactobacilles pourraient réduire les risques de certains types de cancer et inhiber la croissance de certaines tumeurs. Certaines bactéries probiotiques sont actives lorsqu'elles sont ingérées, c'est le cas des bactéries du yaourt. De plus, ces bactéries sont utilisées

comme vecteur d'expression permettant le transfert d'ADN recombinant (via des plasmides d'expression) dans les cellules intestinales de l'hôte.

Notre projet de recherche vise à étudier l'effet de ces bactéries, utilisées comme vecteur d'expression, sur le développement du CaP et son évolution vers la résistance. En effet, l'évolution de ces cancers est difficile à définir par manque de marqueurs biologiques précis. Les mécanismes moléculaires impliqués dans le développement des cancers résistants à la castration (ablation de la prostate) semblent être liés principalement à l'activation du Récepteur des Androgènes (RA) en dépit de la privation en androgènes, mais également à l'altération de gènes suppresseurs de tumeurs et/ou l'hyperactivation ou la surexpression de gènes de résistance à l'apoptose. En dépit des nouvelles générations de molécules thérapeutiques, les problèmes de résistance persistent. Ainsi, un des enjeux majeurs de la recherche actuelle est d'identifier de nouvelles molécules thérapeutiques pour soigner le CaP résistant. Dans cette perspective, notre projet vise à étudier le potentiel thérapeutique des souches bactériennes du *Lactobacillus* et *Lactococcus* porteuses de vecteurs d'expression contenant des ADNc des peptides anti-cancéreux déjà testés dans notre laboratoire comme la Drs B2 et la NRP-1. Ce projet permettra de tester un nouveau mode de délivrance de ces molécules thérapeutiques qui pourrait s'avérer très prometteur, moins toxique et moins agressif. Ce projet permettra aussi de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les effets anti-tumoraux de certaines bactéries dans le CaP. Les modèles *in vivo* utilisés sont importants car plus représentatifs de la complexité des interactions et processus intervenant dans le développement de cancers. De plus, la souris est un modèle de référence dans l'étude de pathologies cancéreuses dont nous avons l'expérience. Enfin, ces études visent à développer de nouveaux traitements qui ciblent plus spécifiquement les cellules tumorales et apportent un bénéfice clinique significatif aux patients.

Les différents groupes de souris (10 souris/groupe) recevront en sous cutané une injection de cellules tumorales puis seront traités dès le lendemain de cette injection ou après le développement des tumeurs (2 semaines) par gavage avec les différentes bactéries et ceci sur une période de 3 à 4 semaines, selon l'évolution des tumeurs. A la fin de la procédure, la tumeur ainsi que différents organes seront prélevés pour des analyses biochimiques et immuno histologiques.

Toutes nos expériences seront menées dans le respect des règles des 3R. En effet, le nombre de souris par groupe est réduit à la limite de l'analyse statistique acceptable. L'expérience est planifiée et organisée afin d'éviter tout stress pour l'animal. Toutes les souris seront suivies afin d'évaluer leur comportement et par conséquent leur bien-être. Un suivi clinique des animaux sera réalisé tout au long des expériences, avec mise en place de points limites précis (taille de la tumeur, perte d'activité, difficultés locomotrices, difficultés à respirer, dos voûté poils hérissés) qui permettront d'éviter toute souffrance. Pour enrichir le milieu, les cages auront de la sciure de bois, du coton, et des briquettes de bois. Le modèle animal ne peut pas être actuellement remplacé par des tests alternatifs pour l'étude des effets explorés.

Pour la réalisation de notre projet, nous utiliserons au maximum 270 souris pour l'accomplissement des expériences décrites ci-dessous pour une période de trois années.

14435 Le projet s'inscrit dans l'étude des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, et plus particulièrement la maladie de Crohn. La maladie de Crohn touche plus de 1 million de personnes en Europe. C'est une maladie digestive particulièrement invalidante pour les personnes atteintes. A ce jour aucun traitement curatif n'existe. L'enjeu de ce travail de recherche est de comprendre la maladie de Crohn et plus précisément, quelle est l'origine de la formation de certains anticorps chez les patients. Parmi ces anticorps, les ASCA (« anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies ») sont trouvés en quantité élevée chez les patients et leur origine est inconnue. Nous envisageons plusieurs hypothèses à l'origine de leur production 1/une origine alimentaire ciblant une levure non pathogène utilisée dans l'industrie agroalimentaire, 2/ une origine « endogène » avec une levure non pathogène isolée du microbiote d'un patient atteint de maladie de Crohn, et 3/une origine infectieuse (levure responsable de la candidose). Nous testerons ces 3 hypothèses en contexte normal ou d'inflammation intestinale modérée.

Afin de réaliser ces études, nous avons recours à un modèle de souris portant un gène humain (souris transgéniques). Les souris expriment au niveau intestinal une protéine anormalement exprimée chez certains patients atteints de maladie de Crohn. Les animaux ne présentent aucune altération du fait de la présence du transgène. Ce projet compte une seule expérience avec 7 lots de 6 souris. L'expérience nécessite donc 42 souris transgéniques au total. Nous travaillerons sur les femelles. Comme il s'agit d'un modèle hétérozygote, il faut générer $42 \times 4 = 168$ animaux pour obtenir 42 femelles hétérozygotes. Le gène humain est détecté par amplification par PCR. La durée totale du projet est de 6 mois, elle prend en compte le temps de génération des animaux transgéniques et la réalisation du projet scientifique.

Dans ce protocole expérimental, une partie des souris recevront dans l'eau de boisson un traitement induisant une inflammation intestinale modérée, les autres auront de l'eau. Elles recevront par gavage une dose quotidienne de levure alimentaire, ou d'une souche de levure non pathogène provenant d'un patient, ou de levure responsable de la candidose ou aucune levure. Afin de suivre la production d'ASCA, deux prélèvements sanguins seront réalisés sous anesthésie à 7 jours d'intervalle. Le volume maximal de sang à prélever est finement calculé selon le poids des animaux. Un prélèvement final de sang sera effectué sur animaux anesthésiés (sans réveil), ils seront immédiatement euthanasiés par dislocation cervicale. Des prélèvements de tissus seront réalisés pour des analyses histologiques, biochimiques et moléculaires pour maximiser l'utilisation de ces animaux.

-Les expériences seront réalisées dans le respect de la règle des 3R.

Remplacer : Il est nécessaire de travailler sur un organisme entier afin de savoir si les levures peuvent générer une réponse immunitaire en présence ou absence d'un contexte inflammatoire. La souris est un modèle de choix car il existe un modèle transgénique exprimant la protéine humaine anormalement exprimée chez les patients atteints de maladie de Crohn.

Réduire : -Avec 6 animaux/lot, nous pourrions réaliser des tests statistiques robustes pour savoir si l'induction des ASCA est associée à un traitement donné chez les souris. Une seule expérience est réalisée, réduisant ainsi le nombre d'animaux contrôles nécessaires si nous avons procédé en plusieurs expériences.

Raffiner : -Les animaux seront disposés dans des cages de 450 cm² (6 animaux par cages) et auront libre accès à l'eau et la nourriture. Les conditions d'hébergement sont les suivantes : température 20-24°C, hygrométrie 50 plus ou moins 10%, cycle 12h/12h, éclairage 350/450 lux. Une période d'acclimatation sera réalisée avant le début de la procédure (une semaine). Un enrichissement est proposé aux souris : lamelles de cartons compressées et maisonnettes.

-Une colite modérée est attendue en réponse au traitement dans l'eau de boisson. Les souris seront surveillées quotidiennement pendant toute la durée de l'expérience pour détecter tout signe de souffrance.

Si un animal remplit 3 des critères suivants (points limites)

1/perte de poids > à 15% 2/immobilité, ou position recroquevillée, ou dos vouté, ou augmentation de la fréquence respiratoire/respiration pénible 3/signes cliniques d'inflammation intestinale (pelage et orifices souillés avec diarrhée et/ou présence de sang dans les fèces) il sera immédiatement sorti du protocole et euthanasié par dislocation cervicale après anesthésie à l'isoflurane.

-Les animaux seront mis à mort à par dislocation cervicale immédiatement après le dernier prélèvement sanguin sous anesthésie par inhalation d'isoflurane.

14436 L'hypertension pulmonaire (HTP) est une maladie grave, caractérisée par une élévation de la pression artérielle pulmonaire qui conduit à une hypertrophie cardiaque droite, puis à une insuffisance cardiaque droite, à l'origine du décès des patients. Les traitements disponibles actuellement ne sont pas curatifs. La recherche est donc très active dans l'identification de nouvelles cibles afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques à visée curative. Pour cela, des modèles animaux pertinents sont indispensables. L'objectif de ce projet est donc d'utiliser des modèles animaux (rats, souris) d'HTP expérimentale classiquement utilisés dans la littérature et au laboratoire de façon à pouvoir s'appuyer sur de nombreuses données déjà acquises. Il existe

différents type d'HTP chez l'homme et nous allons donc utiliser deux modèles animaux pour étudier d'une part l'HTP associée à une hypoxie chronique (HC) similaire aux HTP associées aux maladies respiratoires hypoxémiantes (asthme, bronchite chronique, fibrose...) et d'autre part, l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) induite par une injection de monocrotaline (MCT) pour étudier l'HTAP idiopathique (de cause inconnue). Pour cette étude, nous avons besoin de 170 rats/an et 816 souris/an dont la moitié seront des souris transgéniques soit au total 850 rats et 4080 souris pour la durée du projet (5 ans). Le nombre d'animaux utilisés apparaît élevé mais 4 statutaires (et leurs étudiants) travaillent sur ce projet. Le rat et la souris sont des espèces classiquement utilisées en recherche et l'utilisation de la souris permet l'utilisation de modèles transgéniques.

Pour optimiser le nombre d'animaux utilisés, (1) les rats contrôles utilisés seront les mêmes pour les deux type d'HTP, (2) une planification des expériences sera établie pour optimiser au mieux les techniques réalisées sur chaque animal avec utilisation de cellules en culture. Ainsi, nous optimiserons l'utilisation des animaux et les remplacerons par des cellules en culture autant que possible. Par ailleurs, une attention permanente sera portée au bien-être des animaux tout au long du protocole, en particulier par une surveillance quotidienne et par l'enrichissement du milieu (tunnels pour les rats et igloos avec roues et/ou tunnels pour les souris). Chez l'homme, l'HTP/HTAP n'induisent pas de souffrances élevées mais plutôt une gêne respiratoire exacerbée lors d'un effort. Etant donné que les animaux ne seront pas soumis à l'effort, la souffrance est considérée comme modérée dans ce type de protocole d'induction d'une maladie.

Toutefois, une surveillance des animaux sera réalisée, de manière à détecter tout signe de stress et/ou de douleur. Si nécessaire, une administration d'antalgique (carprofène) sera réalisée dans un premier temps. En cas de souffrance ou de détresse persistante pour l'animal, une procédure d'euthanasie par injection intrapéritonéale d'Exagon® et de lidocaïne sera mise en œuvre. Les mesures du débit cardiaque et de la pression artérielle pulmonaire seront réalisées sous anesthésie (kétamine/xylazine ou isoflurane) afin d'éviter le stress et/ou la perception de la douleur, et les animaux seront euthanasiés sans réveil à la fin de ces expérimentations par injection intrapéritonéale d'Exagon®. Le potentiel curatif de substances pharmacologiques sera testé à l'aide de mini-pompes osmotiques installées en sous-cutané dans le dos de l'animal sous anesthésie (kétamine/xylazine).

14437 Le but du projet est de déterminer l'impact de la délétion d'un gène sur la mise en place des mécanismes d'homéostasie lipidique, dans le cadre d'un régime enrichi. Ce projet sera réalisé en utilisant des souris génétiquement modifiées, afin de mettre en évidence l'impact de la suppression du gène, par comparaison avec des animaux contrôles non modifiés. Ce projet visant à étudier un mécanisme physiologique complet, l'utilisation d'un mammifère est indispensable car aucune méthode *in vitro* ou *in silico* ne peut actuellement se substituer à l'étude du gène cible dans son environnement et ses interactions au sein de l'organisme.

Ce projet pourra s'appliquer à 10 lignées différentes par an, pour un nombre total d'animaux de 360 souris. Ces lignées ne concerneront que des phénotypes non dommageables et une étude rétrospective sera mise en place le cas contraire.

Pour procéder à cette étude, des souris mutantes n'exprimant plus le gène d'intérêt sont générées et étudiées en comparaison avec des animaux contrôles. Une cohorte de 36 animaux sera utilisée afin d'obtenir une puissance statistique suffisante à l'étude. Ces animaux seront soumis à un protocole comportant différents tests permettant de caractériser les capacités d'homéostasie lipidique, à différents âges mais aussi à des tests permettant de caractériser la lignée, lorsque celle-ci n'a pas encore été étudiée sur certains domaines (fonction cardiaque par exemple).

Tous les tests utilisés font partie des tests de phénotypage classiquement utilisés dans la recherche préclinique et décrits dans la littérature. Cette batterie de tests permet de mettre en place un corpus de données visant à déterminer l'impact de cette délétion sous un régime standard, mais aussi dans le cadre d'un enrichissement du régime en sucres et en graisse.

Ce protocole permet ainsi de réduire le nombre d'animaux utilisés afin de satisfaire les exigences de réduction.

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

Les analyses faites sur ces animaux seront optimisées afin d'éviter toute redondance dans l'étude des phénotypes engendrés par la mutation.

Les souris utilisées sont issues de lignée en cours d'élevage et pour lesquelles aucun phénotype létal ou majeur n'a été observé.

14438 Les leucémies aiguës lymphoblastiques de type B (LAL-B), équivalents pathologiques des lymphocytes B en différenciation, sont la cause principale de cancer chez l'enfant, et bien que moins fréquentes, concernent un nombre de cas similaires chez l'adulte. Malgré l'amélioration des traitements de chimiothérapie, le pronostic reste mauvais dès le diagnostic chez l'adulte, et à la rechute chez l'enfant. Par ailleurs, les enfants guéris d'une leucémie peuvent développer tardivement des séquelles de leur traitement anticancéreux. Il existe donc un réel besoin à mettre au point des thérapies ciblées adjuvantes aux traitements standards, dans le but de limiter les risques de rechute mais aussi de diminuer les doses de chimiothérapie et leurs effets secondaires liés.

Pour ce type d'étude, puisqu'il est impossible d'obtenir des conclusions fiables *in vitro* nous ne pouvons actuellement nous passer des expérimentations conduites sur des animaux pouvant simuler les principales propriétés biologiques des leucémies humaines. L'objectif de cette demande est donc, de développer les modèles précliniques spécifiques de la LAL-B qui permettront notamment de tester différentes stratégies thérapeutiques innovantes ou de caractériser et de lutter contre les phénomènes de rechutes ou résistances aux chimiothérapies trop fréquemment observés en clinique. Ces modèles que nous souhaitons mettre en place, basés sur la xénogreffe de cellules leucémiques du patient à des souris immunodéficientes, sont largement décrits dans la littérature pour reproduire l'hétérogénéité génétique à l'origine de la maladie, pour récapituler les réponses aux traitements de la tumeur parentale et enfin pour permettre de prédire le choix de la cible thérapeutique et du schéma thérapeutique.

Dans la présente demande d'autorisation, nous planifions l'établissement d'une biobanque de LAL-Bs chez la souris NSG, qui devront être caractérisées en terme de temps de progression, de distribution systémique, de transplantations sériées ainsi que pour leur sensibilité/résistance à la vincristine, le traitement référence actuel en clinique. L'ensemble de ces données sera utile à plusieurs projets fondamentaux de notre centre de recherche qui concernent notamment les phénomènes de résistances thérapeutiques.

Nous utiliserons la méthode des 3 R (Réduction, Raffinement et Remplacement) pour réduire à son minimum le nombre d'animaux tout en couvrant la diversité moléculaire de la LAL-B. Ce dernier point sera crucial lors des études visant à prédire la réponse thérapeutique via l'utilisation des différents modèles de leucémies ainsi établis. Ce projet d'établissement d'une banque de xénogreffes nécessitera donc 1538 souris immunodéficientes de type NSG. De plus, dans un souci de raffinement, la détection précoce et encore asymptomatique du développement leucémique se fera par cytométrie de flux à partir de prélèvements sanguins réalisés sous anesthésie gazeuse (Vetflurane 3%). Les animaux seront suivis quotidiennement. L'apparition de signes d'inconfort ou d'éventuelle souffrance nous conduira à choisir l'action appropriée à mener en fonction d'une grille de score de douleur spécifique de ces modèles de pathologies hématologiques.

Afin de réduire le stress et d'améliorer le cadre de vie des animaux, nous optimiserons les conditions de leur hébergement, par la présence d'enrichissement dans les cages (copeaux de bois compactés et/ou coton), et par le maintien des animaux en groupes de 4 à 5 afin de respecter leur instinct grégaire.

14439 L'alcoolodépendance ou alcoolisme est l'addiction à l'alcool éthylique (éthanol) contenu dans les boissons alcoolisées. L'Organisation mondiale de la santé (OMS) reconnaît l'alcoolisme comme une maladie et le définit comme des troubles mentaux et troubles du comportement liés à l'ingestion fréquente d'alcool éthylique. Cette perte de contrôle s'accompagne généralement d'une

dépendance physique caractérisée par un syndrome de sevrage à l'arrêt de la consommation (pharmacodépendance), une dépendance psychique, ainsi qu'une tolérance (nécessité d'augmenter les doses pour obtenir le même effet).

Chaque année, en France, le nombre de décès liés à la consommation d'alcool se situe entre 40000 et 50000, soit près de 10 % de la mortalité toutes causes confondues. On estime à cinq millions les personnes qui ont des difficultés médicales, psychologiques ou sociales à mettre en relation avec l'alcool.

Il existe à ce jour différents traitements médicamenteux de l'alcoolisme, mais aucun n'est reconnu comme suffisamment efficace. La recherche de nouveaux traitements d'aide au sevrage alcoolique et de prévention de la rechute constitue un objectif majeur de santé publique.

Différents tests animaux permettent d'aborder différentes composantes de l'alcoolisme liées à la dépendance physique à l'alcool, en particulier les symptômes de sevrage, ou aux propriétés addictives de l'alcool.

L'étude sera réalisée à l'aide d'un test de mesure de la consommation volontaire d'alcool à la suite d'une période prolongée d'alcoolisation. Ce test constitue l'une des procédures les plus proches de la clinique humaine.

Une étude standard d'un produit administré seul comprend 4 groupes d'animaux

- Un groupe témoin, recevant le véhicule et trois groupes recevant la molécule testée à 3 doses.

Une étude standard de deux produits administrés seuls et en combinaison comprend 9 groupes d'animaux

- Un groupe témoin, quatre groupes recevant les molécules 1 et 2 à 2 doses.

- Quatre groupes recevant les molécules 1 et 2 aux 2 doses.

Des études préliminaires et les données bibliographiques montrent qu'un nombre de 8 animaux par groupe est nécessaire et suffisant pour assurer une robustesse satisfaisante des résultats. L'utilisation d'un nombre inférieur d'animaux a une probabilité importante d'entraîner la non-validité de l'étude, conduisant à la refaire, et par conséquent à utiliser un nombre d'animaux plus élevé.

=> Nombre total d'animaux = 8400 animaux = (30 produits seuls x 4 groupes x 8 animaux par groupe + 10 combinaisons de 2 produits x 9 groupes x 8 animaux par groupe) x 5 ans

Respect de la règle des 3R

- Réduire. Le nombre total d'animaux utilisés pour une étude est fonction du nombre de groupes et du nombre d'animaux par groupe nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement interprétables.

- Justification du nombre de groupes. Le groupe témoin est nécessaire à chaque expérience compte tenu des variations de performances entre lots d'animaux. Le groupe produit de référence (amphétamine ou méthylphénidate) est nécessaire pour valider l'expérience et pour comparer l'efficacité du produit testé à un produit de référence. Il est généralement nécessaire de tester le produit à trois doses pour mesurer la relation dose-effet, mais un nombre de doses inférieur ou supérieur peut être justifié en fonction de l'état de connaissance du produit.

- Justification du nombre d'animaux par groupe. Compte tenu de la variabilité interindividuelle des variables mesurées dans ce test, ce nombre a été fixé à 12 animaux par groupe. L'utilisation d'un nombre inférieur d'animaux a une probabilité importante d'entraîner la non-validité de l'étude, conduisant à la refaire, et par conséquent à utiliser un nombre d'animaux plus élevé.

- Justification de la restriction alimentaire. Le test consistant à délivrer des boulettes après des réponses de l'animal, la restriction alimentaire est nécessaire pour que les animaux présentent des performances optimales de réalisation de la tâche. Cette restriction est fonction de l'âge et de l'espèce, rats ou souris. Elle est calculée de façon, à la fois, à permettre un niveau de motivation élevé pour réaliser la tâche et n'entraîner aucune détérioration de l'état physique de l'animal. Cet état physique est évalué tous les jours animal non cachétique et présentant une activité normale dans la cage d'élevage.

- Raffiner. Des animaux présentant des signes de souffrance sont euthanasiés. Outre la motivation éthique conduisant à cette euthanasie, celle-ci est requise pour des raisons expérimentales, la souffrance d'un animal biaisant les variables comportementales mesurées. L'utilisation de traitements pour pallier à cette souffrance est exclue, ces types de traitement étant susceptibles de modifier le comportement des animaux et l'action pharmacologique des produits étudiés.

- Remplacer. Il n'existe pas à ce jour de modèle n'utilisant pas d'animaux ou nécessitant un nombre plus réduit d'animaux ou ayant un degré de sévérité inférieur permettant d'obtenir des informations équivalentes à celles obtenues par le présent modèle.

14440 Le présent projet vise à déterminer l'action antidiabétique et anti-obésité chez la souris de la consommation d'une combinaison d'extraits végétaux (*Momordica charantia* et *Cleistocalyx operculatus*). Le travail s'inscrit dans un contexte général d'études précliniques de compléments alimentaires ciblant le traitement des troubles de l'homéostasie énergétique (diabète, obésité). Ce travail sera réalisé chez des souris obèses, déficientes en leptine (ob/ob) recevant par administration per os, les extraits végétaux ou leur véhicule sur une période de 3 semaines. L'obésité, qui se définit par un excès de poids en raison d'une augmentation excessive de la masse adipeuse, est connue pour augmenter la prévalence des maladies cardiovasculaires, du diabète de type 2 et de certains types de cancer. L'obésité est reconnue comme une maladie par l'organisation mondiale de la santé depuis 1997. Actuellement à l'échelle mondiale, on estime à plus de 600 millions de personnes le nombre de personnes obèses et à 2,8 millions le nombre de personnes décédant chaque année du fait de leur surpoids ou de leur obésité. Ces nombres ne font qu'augmenter depuis des décennies, que ce soit dans les pays développés ou dans les pays émergents. Souvent associé à l'obésité, le diabète de type 2 ou diabète sucré est l'une des maladies dont la croissance est la plus rapide au monde. Cette pathologie métabolique se caractérise par une hyperglycémie résultant d'une anomalie de la sécrétion d'insuline, d'une action de l'insuline ou des deux à la fois. Depuis l'Antiquité, diverses plantes ont été utilisées à des fins médicinales dans le monde entier. *Momordica charantia* L. (*M. charantia*), un membre de la famille des cucurbitacées communément appelé melon amer est largement répandu dans les régions tropicales et subtropicales du monde. Cette plante a longtemps été consommée comme aliment et médicament dans de nombreux pays, notamment en Chine, en Inde, en Malaisie et en Thaïlande. Il a été utilisé en médecine traditionnelle pour ces nombreuses propriétés en particulier pour le traitement du diabète sucré. Il est encore utilisé dans la prévention et le traitement du diabète dans de nombreux pays en développement. Ce n'est que beaucoup plus récemment que la communauté scientifique s'est intéressée aux différentes propriétés biologiques de *M. charantia*. Plusieurs études scientifiques suggèrent qu'une variété d'extraits de *M. charantia* peut être utilisée comme remède pour le traitement de l'obésité et du diabète. *Cleistocalyx operculatus* est une plante largement répandue dans l'Asie du sud dont l'extrait est couramment utilisé en médecine traditionnelle. Il a été récemment montré que l'extrait de *Cleistocalyx operculatus* exerçait une activité anti-hyperglycémique. La 2', 4'-dihydroxy-6'-méthoxy-3',5'-diméthylchalcone (DMC), un composé majeur de cet extrait de plante, possède avoir des effets anti-tumoraux, antioxydants et anti-inflammatoires. Récemment, il a été montré que le DMC exerce un effet inhibiteur sur l'adipogenèse et des effets anti-glucotoxiques dans les cellules β pancréatiques. Dans le présent projet, nous souhaitons tester l'effet de la consommation combinée de *M. charantia* et de *Cleistocalyx operculatus* sur l'obésité et le diabète en utilisant une souche de souris présentant génétiquement ces troubles métaboliques. En exerçant leur action sur des cibles a priori distinctes, la combinaison des deux extraits végétaux, qui n'a jamais été testé jusqu'ici, pourrait s'avérer efficace pour lutter contre l'obésité et le diabète.

Dans le cadre des 3R, l'utilisation d'animaux à des fins scientifiques se justifie ici car il n'existe, à ce jour, aucun modèle de substitution *in vitro*, n'utilisant pas l'animal de laboratoire, permettant de tester l'efficacité de composé à visé thérapeutique sur l'obésité et le diabète. Nous réaliserons cette expérimentation en réduisant le nombre d'animaux grâce à un suivi longitudinal sur toute la période expérimentale. L'ensemble des mesures et des analyses seront donc effectués sur une même cohorte. Notre expertise en expérimentation animale, nous permet de définir au plus juste le nombre

d'animaux nécessaires estimé ici à 32. Les animaux faisant l'objet de cette étude auront été au contact et manipulés par les personnels sur une base journalière pendant 4 semaines (1 semaine d'habituation + 3 semaines de traitement). Cette précaution est importante pour réduire au minimum le stress des animaux. Afin de minimiser la souffrance et l'angoisse, les animaux sont hébergés dans des cages transparentes dont le milieu est enrichi par des cylindres et des dômes en carton. Par ailleurs, nous évaluerons la souffrance grâce à la mise en place d'un score de souffrance lors de la pesée quotidienne des animaux, afin d'administrer si nécessaire un traitement antalgique (Buprénorphine) ou sortir l'animal concerné de l'étude. Une crème anesthésiante sera également appliquée sur la queue lors des prélèvements sanguins.

14441 Ce test est un modèle utilisé dans la recherche scientifique pour dépeindre le comportement d'anxiété ou de trouble obsessionnel-compulsif (TOC)

Il s'agit d'un modèle éthologique qui n'entraîne aucune souffrance mis à part le stress lié aux injections des agents pharmacologiques étudiés et à l'exploration d'un environnement inconnu.

Une étude standard comprend 96 animaux répartis en 8 groupes de 12 sujets, qui reçoivent le produit testé à 6 doses, un produit de référence et un placebo. Des études peuvent comprendre un nombre plus élevés ou plus faible d'animaux (par exemple pour l'étude d'un nombre de doses supérieur ou inférieur).

Le nombre maximum de produits testés par an est de 12.

Le nombre total maximum d'animaux utilisés sur 5 ans est de $5760 = 96 \text{ animaux/étude} \times 12 \text{ études/an} \times 5 \text{ ans}$.

Respect de la règle des 3R

- Réduire. Le nombre total d'animaux utilisés pour une étude est fonction du nombre de groupes et du nombre d'animaux par groupe nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement interprétables.

- Justification du nombre de groupes. Le groupe témoin est nécessaire à chaque expérience compte tenu des variations de performances entre lots d'animaux. Le groupe produit de référence (amphétamine ou méthylphénidate) est nécessaire pour valider l'expérience et pour comparer l'efficacité du produit testé à un produit de référence. Il est généralement nécessaire de tester le produit à trois doses pour mesurer la relation dose-effet, mais un nombre de doses inférieur ou supérieur peut être justifié en fonction de l'état de connaissance du produit.

- Justification du nombre d'animaux par groupe. Compte tenu de la variabilité interindividuelle des variables mesurées dans ce test, ce nombre a été fixé à 12 animaux par groupe. L'utilisation d'un nombre inférieur d'animaux a une probabilité importante d'entraîner la non-validité de l'étude, conduisant à la refaire, et par conséquent à utiliser un nombre d'animaux plus élevé.

- Justification de la restriction alimentaire. Le test consistant à délivrer des boulettes après des réponses de l'animal, la restriction alimentaire est nécessaire pour que les animaux présentent des performances optimales de réalisation de la tâche. Cette restriction est fonction de l'âge et de l'espèce, rats ou souris. Elle est calculée de façon, à la fois, à permettre un niveau de motivation élevé pour réaliser la tâche et n'entraîner aucune détérioration de l'état physique de l'animal. Cet état physique est évalué tous les jours animal non cachétique et présentant une activité normale dans la cage d'élevage.

- Raffiner. Des animaux présentant des signes de souffrance sont euthanasiés. Outre la motivation éthique conduisant à cette euthanasie, celle-ci est requise pour des raisons expérimentales, la souffrance d'un animal biaisant les variables comportementales mesurées. L'utilisation de traitements pour pallier à cette souffrance est exclue, ces types de traitement étant susceptibles de modifier le comportement des animaux et l'action pharmacologique des produits étudiés.

- Remplacer. Il n'existe pas à ce jour de modèle n'utilisant pas d'animaux ou nécessitant un nombre plus réduit d'animaux ou ayant un degré de sévérité inférieur permettant d'obtenir des informations équivalentes à celles obtenues par le présent modèle.

14442 La maladie de Huntington est une affection neurodégénérative héréditaire qui entraîne une altération profonde et sévère des capacités physiques et intellectuelles. La personne malade perd peu à peu son autonomie et devient dépendante pour les actes de la vie quotidienne. La maladie touche indistinctement les hommes et les femmes quand un des parents est atteint, les enfants ont un risque sur deux d'hériter du mauvais gène qui provoquera la maladie, généralement à l'âge adulte. C'est une maladie génétique qui ne saute pas de génération. Les symptômes peuvent varier d'un malade à l'autre. On peut observer sur le plan moteur démarche instable, agitation, impatience, tics et mouvements saccadés. Sur le plan intellectuel, on notera la perte du sens de l'orientation, troubles de la mémoire, troubles émotionnels, lassitude, sautes d'humeur, agressivité, repli sur soi. Dans tous les cas les décès sont observés 20 ans après les premiers symptômes qui apparaissent entre 30 et 50 ans. Des traitements sont à l'étude, qu'ils soient médicamenteux ou autres, mais n'ont pas encore abouti à un ralentissement de la progression de la maladie. Les seules médications actuellement utilisées sont symptomatiques. C'est dans un modèle de souris génétiquement modifiées (appelées souris R6/2) que furent initialement mises en évidence des inclusions nucléaires. Elles furent secondairement identifiées chez l'homme. Le modèle souris a donc permis de découvrir une lésion humaine jusqu'alors passée inaperçue. L'enrichissement de l'environnement retarde les signes moteurs et l'atrophie cérébrale associée dans ce modèle. Ainsi il existe une grande similitude entre la maladie humaine et les symptômes observés dans le modèle souris R6/2, ce qui justifie l'utilisation de ce modèle dans la recherche de médicaments contre cette maladie mortelle. L'identification de nouveaux traitements contre la MH est un vrai défi. Le but de cette étude sera d'évaluer le potentiel thérapeutique en bi-thérapies de 2 composés sur le modèle souris R6/2 de la maladie de Huntington. Ces composés ont été inclus dans des nanoparticules, ce qui permet leur administration buccale ou rectale et leur absorption au travers des muqueuses. Individuellement chaque composé a montré des effets protecteurs de la maladie de Huntington dans des modèles de la maladie. Aussi une bithérapie nous semble une stratégie adéquate pour pallier les symptômes variés de cette maladie. Cent vingt six souris seront utilisées pour 2 séries d'expérimentation afin de tester des symptômes différents.

La règle des 3R sera appliquée comme suit

1- Afin de remplacer au mieux les expériences par des méthodes alternatives Toutes les expériences effectuées sur les souris sont précédées de tests effectués dans des modèles drosophile de la maladie de Huntington.

2- Afin de réduire le nombre d'animaux et de limiter la répétitivité, nous avons évalué grâce à nos expériences précédentes que le nombre d'animaux nécessaire était de 10 animaux par groupe permettant d'obtenir des données statistiques.

3- Afin de raffiner le traitement, nous avons opté pour des traitements par administration orale, ce qui est encore extrêmement peu utilisé dans le cas de maladies neurodégénératives.

4- Les souris sont gardées dans des milieux enrichis (copeaux et jouets ajoutés).

14443 Les tiques sont des acariens pouvant contenir et transmettre de nombreux pathogènes, dont la bactérie responsable de la maladie de Lyme (*Borrelia burgdorferi*) et celle responsable de la maladie dite de la griffe du chat (*Bartonella henselae*). Le changement climatique et les hivers plus doux entraînent en Europe une augmentation de l'abondance des tiques et donc une augmentation de ces maladies.

La maladie de Lyme est provoquée par la transmission de la bactérie *Borrelia burgdorferi* après morsure par une tique. La bactérie peut survivre et se reproduire dans la salive de la tique, mais également chez différentes espèces animales, comme la souris ou les oiseaux. Une tique non infectée devient porteuse et vectrice de la bactérie après avoir mordu un animal infecté. Elle pourra ensuite transmettre la maladie à un autre animal, ou à l'Homme. La maladie de Lyme touche entre 5 000 et 6 000 individus par an en France, et peut entraîner de graves séquelles.

La bartonellose ou maladie de la griffe du chat est provoqué par *Bartonella henselae*, et transmise par les chats. Cette bactérie pathogène peut survivre longtemps dans des globules rouges et se

multiplier dans les glandes salivaires de tiques ayant mordu un chat infecté. Aux Etats-Unis, environ 20 000 cas de la maladie de la griffe du chat sont répertoriés chaque année.

Les buts de cette étude sont

- D'évaluer la progression des bactéries aux différents organes après injection intradermique unique, reproduisant la morsure d'une tique, chez la souris.
- D'évaluer l'effet d'une solution inhibante appliquée de manière répétée sur la peau, sur la progression de ces 2 bactéries après injection intradermique chez la souris
- D'évaluer l'effet de la solution inhibante appliquée de manière répétée sur la peau chez des souris non infectées.

A terme, cette solution inhibante pourra être commercialisée sous forme de patch pour lutter contre une éventuelle infection à ces 2 pathogènes chez des personnes mordues par des tiques.

La souris est un modèle validé de la maladie de Lyme chez l'homme. Elle est également un des principaux réservoirs de la bactérie, étant la première infectée par les jeunes tiques, plus petites.

Le mécanisme d'infection et la propagation de la bactérie dans l'organisme est un processus dynamique qui ne peut se faire qu'au sein d'un organisme vivant. L'étude de l'effet inhibant d'un produit appliqué sur la peau sur cette infection est également un processus dynamique, car le produit doit pouvoir traverser les différentes couches de la peau pour pouvoir arriver dans la circulation sanguine et avoir un effet sur l'infection bactérienne. De plus, le prélèvement de différents organes permettra de suivre la propagation bactérienne dans l'organisme entier. Le recours à l'animal vivant est donc inévitable.

Au cours de cette étude, 60 souris seront utilisées. Elles seront séparées en 3 groupes de 20 animaux. Le nombre d'animaux utilisés est réduit à un nombre minimum retrouvé dans des publications et ayant permis l'obtention de résultats exploitables statistiquement.

Différents prélèvements (sang, salive, peau et selles) seront réalisés à différents temps afin de suivre l'infection. A la fin de l'étude, différents organes seront prélevés afin de détecter la présence des bactéries.

Afin de raffiner les conditions d'hébergement, les souris de cette étude auront à disposition de l'enrichissement adapté afin d'améliorer le bien-être animal. Elles seront hébergées en groupe de 5 selon leurs sexes et leur groupe d'étude, afin de reproduire leur comportement social naturel. Pour réduire le stress et la douleur des animaux, les actes techniques tels que le rasage ou l'injection intradermique seront réalisés sous anesthésie légère. Les actes de prélèvement seront réalisés de manière à éviter des procédures douloureuses.

Le nombre d'animaux par groupe d'étude est réduit au nombre minimum nécessaire à l'obtention de résultats exploitables, et ce nombre est basé sur la littérature.

14444 Les maladies inflammatoires (MI) chroniques représentent la troisième cause de mortalité dans les pays développés. Ces maladies parfois très distinctes, se caractérisent en fait par une physiopathologie et des symptômes communs. Par exemple, les prédispositions génétiques sont partagées par ces maladies, de même que les facteurs immunologiques responsables des lésions observées chez les patients. Il n'est donc pas surprenant que les traitements de ces maladies soient également partagés.

Une sous-population de cellules immunitaires, les lymphocytes Th17, est très impliquée dans le développement et la progression de ces maladies. La compréhension des mécanismes entraînant leur activation, leur prolifération et leur migration est donc très importante.

Notre équipe a pu démontrer qu'une molécule, le FASL soluble, était capable de favoriser la migration des lymphocytes Th17 au sein des tissus inflammatoires et que, dans un modèle de souris développant un lupus, le blocage du FASL par plusieurs molécules thérapeutiques préalablement approuvées *in vitro*, améliorerait les paramètres cliniques et biologiques de la maladie.

Nous souhaitons étudier le blocage du FASL soluble, dans d'autres modèles animaux de maladies inflammatoires, telles que les vascularites.

En effet, cette molécule pourrait avoir un rôle à jouer dans le développement de ce groupe de maladies, car nous retrouvons des taux élevés de FASL soluble dans le sérum de patients atteints d'une vascularite.

Nous demandons pour réaliser l'ensemble de nos expériences, 312 souris sur une période de 3 ans. Les dispositions prises pour l'application de la règle des 3R seront les suivantes

Remplacer les modèles animaux des méthodologies de culture cellulaire et de modélisation *in vitro* ont été implémentées afin de remplacer au possible l'utilisation d'animaux pour répondre à certaines questions spécifiques de ce projet. Mais seul un modèle murin récapitulant les éléments de la physiopathologie des vascularites observée chez l'homme, permettra de vérifier l'efficacité thérapeutique et l'absence de toxicité cellulaire des molécules thérapeutiques testées.

Réduire le nombre d'animaux en expérimentation pour nos expériences, nous avons prévu le nombre nécessaire et suffisant d'animaux, pour garder une puissance statistique dans le traitement des résultats et avoir le nombre de contrôles internes obligatoires, pour prouver l'efficacité des molécules thérapeutiques utilisées.

Afin de respecter la notion de raffinement, et éliminer ou réduire toute douleur, souffrance, angoisse, ou tout dommage durable, susceptible d'être infligé aux animaux, leur bien-être et leur souffrance seront pris en compte de leur naissance à leur mort. Ils seront suivis quotidiennement par le personnel de l'animalerie et les manipulateurs.

Chaque cage recevra du matériel pour nidifier dans le but de rétablir le répertoire comportemental des souris.

Pour les injections par voie intra-veineuse et les prélèvements sanguins les animaux seront anesthésiés, dans une chambre contenant de l'isoflurane à 5%. Une fois les souris endormies, le taux d'isoflurane sera baissé à 2,5% pour les maintenir endormies le temps de la manipulation (moins d'une minute).

14445 Les immunothérapies actuelles sont en plein essor dans le cadre du traitement contre le cancer. Cependant, malgré un effet démontré sur la régression tumorale et l'augmentation de la survie globale, ces thérapies ne sont effectives que dans 20 % à 40 % des patients. Une des hypothèses actuelles pour expliquer la différence de réponse entre patients est la présence ou non d'une réponse immunitaire active pré existante au traitement. Un des domaines actifs de recherche est ainsi lié à la mise au point de modalités de traitements complémentaires qui pourraient soit pré-activer une réponse immunitaire anti-tumorale avant une immunothérapie, soit amplifier cette réponse suite ou en parallèle d'une immunothérapie.

L'objectif de notre étude est donc de caractériser le potentiel des ultrasons focalisés à remplir le rôle de traitement complémentaire pour améliorer la réponse aux immunothérapies, via une induction de la réponse immunitaire anti tumorale locale et / ou systémique.

Les ultrasons thérapeutiques sont aujourd'hui utilisés en clinique pour le traitement du cancer de la prostate et sont à l'étude comme traitement prometteur de nombreuses autres tumeurs solides. Ils présentent l'avantage d'être non invasifs et bien tolérés. Ils ne peuvent cependant pas être utilisés pour traiter de manière systémique, et particulièrement les métastases à distance, première cause de mortalité après un traitement HIFU. Ces traitements par ultrasons focalisés de haute intensité (HIFU) reposent sur une focalisation d'un faisceau d'ondes ultrasonores pour concentrer l'énergie acoustique dans une zone, dont la taille typique est similaire à celle d'un grain de riz. Dans cette région très localisée, il est possible d'induire des effets thermique ou mécanique afin de détruire les cellules tumorales. Des travaux récents ont montré que les HIFU pourraient avoir une action locale et systémique sur la réponse immunitaire anti-tumorale, ouvrant la voie à de nouvelles modalités de traitement.

L'hypothèse de travail est ainsi qu'il est possible d'induire une stimulation de la réponse immunitaire anti-tumorale par un traitement ultrasonore et que cette stimulation pourrait se traduire par une action systémique et potentialiser les immunothérapies. Des résultats préliminaires ont montré qu'une combinaison d'ultrasons focalisés et d'immunothérapies menaient à un meilleur contrôle de la croissance tumorale et à une meilleure survie sur un modèle murin. L'objectif de cette étude est

maintenant de caractériser la réponse immunitaire et l'efficacité clinique induite par un traitement ultrasonore focalisé combiné à un traitement d'immunothérapie dans différents modèles afin d'étudier plus précisément les mécanismes de cet effet synergique.

La démarche 3R (Remplacement, réduction, raffinement) est appliquée plusieurs modèles tumoraux différant sur leur sensibilité aux immunothérapies seront étudiées sur différentes lignées, avec un nombre d'animaux réduit à minima nombre total de 1900 souris pour 69 lots. Cependant, des études statistiques au cours des protocoles seront effectuées et ceux-ci s'arrêteront dès que des résultats significatifs seront obtenus. Les souris seront traitées 2 fois par semaine, un traitement ultrasonore suivi d'un traitement d'immunothérapie, sous anesthésie générale, traitements espacés de 3 jours, sur une durée maximale de 60 jours. L'étude de la réponse immunitaire est rendue impossible *in vitro* de par la complexité des interactions des cellules de l'immunité avec l'environnement tumoral. L'analyse de la réponse immunitaire anti-tumorale face à un traitement ne peut être remplacée par d'autres méthodes alternatives. Les paramètres ultrasonores appliqués auront été préalablement sélectionnés par simulations numériques et tirs sur tissus *ex vivo*. Une définition précise des points limites a été effectuée et ceux-ci seront surveillés régulièrement, contribuant au bien-être animal. L'environnement et l'habitat dans lequel évolueront les souris seront optimisés et toutes les précautions nécessaires seront prises afin que nos animaux soient le moins stressés possibles. Les traitements seront effectués sous anesthésie gazeuse et un traitement antalgique sera mis en place afin de limiter au possible le stress ou une possible douleur.

14446 Aujourd'hui, la gestion thérapeutique des patients atteints de mélanome est un défi majeur. En effet, ce dernier progresse plus rapidement que tous les autres cancers, en particulier dans la jeune population. En raison de la faible efficacité de certaines thérapies actuelles et de leur toxicité, de nouvelles stratégies doivent être développées. Parmi celles-ci, des vaccins basés sur l'utilisation de cellules dendritiques (CDs) sont générés *ex-vivo* à partir de CDs autologues. Ils doivent être réalisés sur mesure pour chaque patient. Cette procédure est complexe et coûteuse, empêchant la généralisation de cette immunothérapie. La délivrance *in-vivo* de molécules immunostimulatrices permettrait de contourner cette procédure.

Dans ce contexte, nous proposons de concevoir et de valider une approche thérapeutique reposant sur la délivrance locale d'un plasmide codant une cytokine, par sonoporation guidée par imagerie ultrasonore (US). Les objectifs sont de

- 1) Affiner les paramètres acoustiques et les concentrations de plasmide codant un gène rapporteur, la luciférase, et de microbulles de gaz permettant la transfection du tissu tumorale, qui sera objectivée par imagerie de bioluminescence.
- 2) Utiliser les paramètres acoustiques optimisés pour vectoriser le plasmide codant l'interleukine-12. L'efficacité de cette thérapie sera évaluée sur un modèle murin de mélanome par imagerie et par l'analyse de la réponse immunitaire.

La prise en compte de la règle des 3R se décline par

Remplacement Dans une première approche expérimentale, nous avons mis en place et validé un dispositif expérimental permettant la vectorisation de plasmides codant des gènes rapporteurs ou thérapeutiques *in-vitro*. Dans la continuité de ce projet, nous souhaitons vectoriser un plasmide codant une cytokine dans un modèle murin de mélanome. Par conséquent, à cette étape du projet, le modèle animal ne peut être substitué par un autre modèle d'étude *in-vitro* ou *in-silico*.

Réduction Sur la base de nos études antérieures, notre étude nécessite 945 souris. Les groupes contrôles et expérimentaux seront constitués de 15 souris. Nous réaliserons une étude statistique pour déterminer l'efficacité de la vectorisation du plasmide codant la luciférase et l'interleukine, et pour évaluer l'efficacité thérapeutique de cette immunothérapie dans un modèle murin de mélanome.

Raffinement Les souris seront hébergées par groupe de 5 en présence d'un objet d'enrichissement (morceaux de carton). Les animaux seront observés une fois par jour. Les procédures expérimentales seront réalisées sous anesthésie générale et les animaux seront manipulés sur un

tapis chauffant avec une restriction minimum de l'isolement social. Les animaux seront placés sous surveillance à leur réveil.

14447 Le vieillissement est considéré comme le principal facteur de risque de la plupart des maladies chroniques chez l'homme, y compris le cancer. Cependant, les mécanismes moléculaires qui contrôlent le vieillissement restent largement inconnus. Notre but global est de les explorer afin de déterminer des cibles qui pourraient diminuer ou retarder les effets du vieillissement.

Le vieillissement s'accompagne d'un grand nombre de modifications moléculaires et cellulaires et notamment d'une accumulation de cellules sénescents dans la majorité des tissus. Ces cellules sénescents jouent un rôle important dans les pathologies liées à l'âge à travers une sécrétion accrue de molécules pro-inflammatoires et d'enzymes remodelant la matrice extracellulaire. Aujourd'hui, le ciblage de ces cellules à l'aide de composés capables de tuer les cellules sénescents ou agissant sur certaines de leurs propriétés, apparaît comme une piste thérapeutique prometteuse dans un grand nombre de pathologies, a fortiori lorsque celles-ci sont associées au vieillissement. Mais le nombre restreint de ces molécules et les effets indésirables induits par certaines d'entre elles, nécessite d'identifier de nouvelles cibles.

Dans ce contexte nous nous intéressons à une voie de signalisation particulière impliquée dans les phénomènes de sénescence, appelée voie de réponse aux protéines mal conformées. Ainsi nous avons montré dans nos précédentes études, sur des cellules cultivées *in vitro*, que l'inhibition d'un certain nombre de facteurs associés à cette voie provoque une réversion du phénotype de sénescence. Une étude plus approfondie de ces différents acteurs pourrait permettre de mieux comprendre l'implication de cette voie au cours de la sénescence mais surtout pourrait potentiellement aboutir au développement de nouvelles approches thérapeutiques. Notre volonté, au cours de cette étude est donc de déterminer si le ciblage de la voie de réponse aux protéines mal conformées *in vivo* pourrait avoir des effets et, ainsi, retarder ou réduire les pathologies liées au vieillissement.

Pour répondre à cette question, nous envisageons de traiter des souris jeunes et âgées à l'aide d'inhibiteurs de différents facteurs de la voie de réponse aux protéines mal conformées qui ont déjà fait leur preuve *in vitro* les cibles d'intérêts ont été identifiées et caractérisées *in vitro*, l'efficacité des inhibiteurs a été évalué *in vitro* afin d'optimiser leurs administrations *in vivo*. L'exigence de remplacement a donc été remplie.

De manière à réduire le nombre de souris, les expériences nécessitant un suivi longitudinal de la sénescence au cours de l'administration des différents inhibiteurs seront réalisées à l'aide de souris transgéniques. Ainsi, à l'aide de ces souris, l'expression d'un facteur clé de la sénescence, sera mesurée par bioluminescence de manière non invasive. Cette méthode nous permettra ainsi de pouvoir suivre, sur une longue période, l'impact global des inhibiteurs. le sacrifice de souris sur des cinétiques permettant d'évaluer l'expression des marqueurs de sénescence au cours du temps ne sera plus nécessaire.

Ces procédures concourent à réduire le nombre d'animaux à 280 pour l'ensemble du projet nombre calculé au plus juste et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement significatifs.

Concernant le raffinement, ce projet sera conduit dans des conditions d'élevage optimales en animalerie SPF, en portoirs ventilés, avec enrichissement de l'environnement des souris et suivi sanitaire permanent par le personnel qualifié de l'animalerie. Par ailleurs, un suivi quotidien des animaux sera réalisé au cours des différentes procédures de manière à s'assurer que les animaux ne présentent pas de signes de souffrance excessive nécessitant l'arrêt des procédures et leur euthanasie. La souffrance sera ainsi évaluée par l'observation de paramètres de poids, de comportement et d'apparence. Ces aspects sont destinés à minimiser toute souffrance, stress ou inconfort pour les animaux.

14448 Les anticorps anti-tumeurs sont utilisés comme traitement contre le cancer pour éliminer spécifiquement les cellules cancéreuses appelées également cellules tumorales. Ces anticorps sont capables de reconnaître les cellules tumorales et de se lier à leur surface. Une fois recouvertes par

les anticorps, les cellules tumorales seront reconnues par des cellules sanguines spécialisées. Parmi les cellules sanguines qui reconnaissent les cellules tumorales, des cellules de grande taille, appelées macrophages, jouent un rôle majeur. Elles sont capables de détruire les cellules tumorales recouvertes par les anticorps spécifiques. Cette destruction des cellules tumorales tapissées d'anticorps par les macrophages est appelée « Cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC) ». Ce phénomène d'ADCC est possible grâce à la présence sur la surface des macrophages de récepteurs spécifiques pour les anticorps, qui sont nommés récepteurs Fc (FcRs). Quand les FcRs se lient aux anticorps, une série de modifications chimiques a lieu à l'intérieur du macrophage, modifications que nous appelons « signalisation » en aval du FcR. Ces modifications chimiques au niveau moléculaire permettent l'activation des macrophages et de leurs fonctions cytotoxiques envers les cellules tumorales recouvertes des anticorps.

Plusieurs expériences sur des modèles de cultures cellulaires montrent que pour induire une cytotoxicité efficace, les FcRs de macrophages doivent être acheminés à l'intérieur du macrophage, vers des vésicules intracellulaires qui s'appellent « endosomes ». Ces vésicules sont l'endroit optimal pour induire la série de modifications chimiques qui aboutit à l'activation du macrophage et à la cytotoxicité. Notre projet envisage de vérifier si ces résultats obtenus *in vitro* sur les cultures cellulaires sont transposables *in vivo* chez l'animal. Pour cela, des expériences de cytotoxicité *in vivo*, chez l'animal, seront réalisées dans un contexte de traitement anti-tumoral. Ces expériences sont possibles car nous disposons d'un modèle de souris déficientes pour les vésicules intracellulaires à partir desquelles les récepteurs FcRs déclenchent la signalisation. Ces souris sont nommées « IRAP-déficiente ».

Pour réaliser nos expériences, nous allons utiliser un modèle de cytotoxicité *in vivo* chez la souris qui a été mis au point dans différents laboratoires depuis plusieurs années et qui est donc bien connu. Il est l'outil le plus approprié pour étudier la pertinence *in vivo* de la signalisation via les FcRs à partir des endosomes. Nous allons injecter par voie intraveineuse dans la veine caudale des cellules tumorales à deux groupes de souris vigiles : des souris « IRAP-déficiente » et des souris contrôle, qui possèdent IRAP. Ensuite, nous allons traiter les souris à différentes reprises en injectant par voie intra-péritonéale un anticorps qui reconnaît les cellules tumorales. Après l'inoculation de la tumeur, les souris seront surveillées pendant 11 jours et ensuite euthanasiées pour pouvoir analyser les tumeurs, leur infiltration par des cellules du système immunitaire et les caractéristiques de ces cellules.

Notre projet aura une durée maximale de 2 ans et son volet scientifique a été approuvé et financé par l'Agence Nationale de la Recherche. De plus, notre approche expérimentale est en adéquation avec la démarche éthique européenne appliquée à l'expérimentation animale (la règle des 3R Remplacer, Réduire, Raffiner) :

Remplacer il est impossible d'évaluer l'effet thérapeutique d'anticorps sur un modèle *in vitro*. Aucun modèle cellulaire ne permet de reproduire la complexité d'une tumeur, l'infiltration de la masse tumorale par les macrophages et le traitement avec l'anticorps thérapeutique. Seul le modèle animal permet de conduire ce projet.

Réduire nous avons besoin d'effectuer au moins trois expériences indépendantes, chaque expérience nécessitant 5 souris IRAP-déficientes traitées avec l'anticorps, 5 souris IRAP-déficientes non-traitées avec l'anticorps, 5 souris contrôle traitées avec l'anticorps et 5 souris contrôle non-traitées avec l'anticorps. Au final, 60 animaux sont nécessaires pour le projet et l'effectif proposé ici tient compte du nombre minimal d'animaux nécessaire pour démontrer une différence statistique significative.

Raffiner les animaux seront gardés en permanence en groupe, dans leurs cages habituelles, dans un milieu enrichi, avec de l'eau et de la nourriture à volonté. Ils seront surveillés quotidiennement par le personnel de l'animalerie et par les expérimentateurs, à partir du jour 1 du traitement par l'anticorps jusqu'à leur euthanasie, à jour 11. La gestion de la douleur se fera selon une grille que nous avons établi pour évaluer les points limites à ne pas dépasser au cours de l'expérimentation (par exemple perte de poids trop importante, animal isolé, manque de communication). Si un des

points limites est atteint, les mesures nécessaires seront prises (administration d'anti-douleur ou euthanasie).

14449 La maladie de Crohn est une maladie inflammatoire dont les principales localisations sont l'intestin grêle, le côlon, l'anus et le périnée. L'incidence de la maladie est en augmentation dans les pays industrialisés depuis les années 1950. 1 patient sur 2 présentera une lésion anopérinéale (LAP) après 20 ans d'évolution de sa maladie.

On distingue les LAP primaires (ulcérations cutanées, fissures cutanées) des LAP secondaires (fistules simples ou complexes correspondant à des tunnels qui se forment naturellement entre le rectum et le périnée afin d'évacuer les abcès). Les LAP secondaires sont plus fréquents et graves, avec à long terme un risque de destruction du sphincter anal, d'incontinence, de stomie définitive (anus artificiel) et de cancer du canal anal. Le traitement actuel est médico-chirurgical associant le traitement de fond de la maladie de Crohn et un traitement chirurgical local de la fistule afin d'obtenir sa fermeture. La récurrence est très fréquente (>50%) aboutissant à une infection du trajet et une destruction du sphincter anal nécessitant une stomie définitive.

La recherche actuelle se concentre sur le développement de traitements locaux des LAP utilisant des médicaments anti-inflammatoires et des cellules souches régénératives (dans le but de fermer le trajet fistuleux et réduire son inflammation). Ces traitements et leur optimisation, bien qu'encourageants, sont limités par le défaut de modèle animal suffisamment proche de la pathologie pour tester leur efficacité avant toute utilisation chez l'homme et par la difficulté de contrôler parfaitement le devenir des cellules souches après leur administration (risque de dissémination). Aussi de nouveaux traitements plus convaincants et sûres assurant la cicatrisation/fermeture du trajet fistuleux sont attendus.

L'objectif principal de notre travail est de tester différents traitements innovants dans le but d'obtenir une cicatrisation complète et durable d'une fistule sur un nouveau modèle expérimental de LAP chez le rat récemment validé dans la littérature. Parmi ces traitements, l'utilisation locale de 2 colles nano particulières (appelées CNP dont l'innocuité chez le rat a été démontrée) de propriétés physico-chimiques différentes (CNP1 et CNP2) sera privilégiée.

Ce projet se déroulera sur une période de deux années et nécessitera un effectif de 80 rats âgés de 7-8 semaines provenant d'un fournisseur agréé. Après une semaine d'adaptation, les rats recevront un lavement unique contenant un inducteur classique d'inflammation basse du côlon reproduisant les symptômes coliques de la maladie de Crohn. Deux fistules seront créées sous anesthésie générale avec un fil chirurgical tressé au 7ème jour du lavement colique. Les fils seront maintenus pendant 28 jours et une évaluation du trajet fistuleux sera réalisée en imagerie IRM sous anesthésie générale (quatre fois à des temps définis) avant d'être ôtés. Les traitements locaux CNP1 et CNP2 seront administrés en une seule fois après le retrait du fil dans le trajet et sous anesthésie générale. Les animaux seront euthanasiés à 7 jours du traitement et l'effet des traitements sur l'inflammation et la cicatrisation du trajet fistuleux sera évalué. Les critères d'évaluation seront cliniques, morphologiques grâce à l'IRM abdomino-pelvienne et histologiques.

Nous espérons montrer une fermeture durable des trajets fistuleux. L'euthanasie pourra être anticipée si des signes de mauvaise tolérance ou de souffrance avérée apparaissent en accord avec le score clinique préétabli (point limite).

Les analyses statistiques nous permettront de définir le retentissement clinique des traitements et de sélectionner le meilleur d'entre eux pour une application future chez l'homme.

Notre approche expérimentale est en adéquation avec les 3R

- Remplacer il est impossible d'évaluer l'effet de traitements novateurs sur les LAP sur un modèle *in vitro* ou *in silico*. Aucun modèle cellulaire ne permet de reproduire la complexité d'une LAP. Seul le modèle animal permet de conduire ce projet. Le rat est le plus petit animal adapté à ce travail notamment pour l'observation des fistules et l'évaluation du traitement par imagerie IRM, avec une littérature validant ce choix.

- Réduire L'effectif proposé tient compte du calcul statistique prévisionnel permettant d'obtenir le nombre d'animaux nécessaire et suffisant pour démontrer une différence significative. Pour éviter

un groupe contrôle supplémentaire, chaque rat sera porteur de 2 trajets fistuleux comme fréquemment observé chez les patients un trajet recevra le traitement étudié et l'autre une injection de sérum physiologique.

-Raffiner Les rats seront surveillés quotidiennement pendant toute la durée du protocole par du personnel compétent. Les mesures nécessaires à la prise en charge de la douleur seront adaptées en fonction de l'état des animaux (analgésie et suivi des signes de mieux/mal être avant et après le traitement). Les effets du traitement seront contrôlés par une surveillance selon un score standardisé. Ce score (prenant en compte la variation du poids de l'animal, son apparence externe, les signes cliniques mesurables et le changement de comportement) correspond à une grille d'évaluation clinique permettant de prendre des mesures progressives (points limites) en fonction de l'élévation du score (augmentation de la fréquence des observations, administration de solution saline pour lutter contre la déshydratation, administration d'antalgiques pouvant être renouvelé toutes les 12h, euthanasie précoce). Ainsi, le protocole expérimental pourra être atténué voire suspendu en cas de mauvaise tolérance ou de souffrance des animaux. L'environnement des animaux sera enrichi afin de leur permettre d'avoir un comportement le plus naturel possible (cotons, maisons, cycle jour/nuit).

14450 Les douleurs chroniques, d'origine inflammatoire, neuropathique ou incisionnelle affectent environ 20 % de la population adulte et jusqu'à 50 % de la population âgée. Elles représentent ainsi un véritable enjeu de santé publique. Malgré l'existence de grandes familles d'analgésiques, les traitements restent souvent inefficaces. Cela est dû en grande partie à un manque de connaissances des mécanismes physiopathologiques de la douleur.

Le but de ce projet est de tester les effets *in vivo* d'une nouvelle toxine naturelle (ou peptides dérivés) la mambalgine, venin de serpent (MAMBA) avec le double objectif de mieux comprendre le rôle des canaux ioniques dans la douleur, mais aussi de proposer de nouvelles pistes thérapeutiques pour le développement de nouveaux analgésiques.

Nous nous proposons de tester un composé d'intérêt, obtenus après criblage fonctionnel d'une bibliothèque de venins comparé à certains analgésiques de référence impliqués dans la douleur. Les effets de chaque composé (mambalgine et Amiloride) seront étudiés *in vivo* après injection chez la souris en réalisant des tests comportementaux de douleur. Les effets observés seront comparés aux effets de l'amiloride, analgésique de référence. Les mécanismes seront étudiés en utilisant des souris génétiquement modifiées dont l'expression d'un gène d'intérêt a été invalidé (« knock-out »). L'objectif de Réduction a été pris en compte en réduisant le nombre d'animaux au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. Le nombre d'animaux total (120 souris pour 2 ans) annoncé ici correspond au nombre maximal nécessaire. Il sera réduit chaque fois que possible, et toute expérience rendue inutile par des résultats précédents obtenus par nous ou d'autres groupes (veille bibliographique mondiale permanente) ne sera pas conduite. L'objectif de Raffinement a été pris en compte en choisissant des tests comportementaux mettant en jeu différentes modalités douloureuses (thermique ou mécanique). Aucune méthode alternative ne permet de satisfaire l'objectif de Remplacement à notre connaissance. Ces études précliniques chez l'animal restent nécessaires au dépôt de brevets et à la poursuite d'études cliniques pour développer de nouveaux analgésiques.

14451 Ce projet aura pour but de sélectionner des molécules pro-cognitives ayant un effet sur les performances mnésiques.

Les animaux utilisés peuvent-être des rats ou des souris adultes, dans ce cas nous évaluerons l'effet des molécules pro-mnésiantes sur le phénomène d'oubli naturel. Nous étudierons également l'effet des molécules pro-cognitives sur les performances mnésiques de rats ou de souris âgés (amnésie liée à l'âge) ou ayant reçu un agent amnésiant (amnésie induite). L'évaluation des performances mnésiques sera réalisée au moyen d'un test comportemental la reconnaissance d'objet. Il s'agit d'un modèle éthologique qui n'entraîne aucune souffrance mis à part le stress lié aux injections des agents pharmacologiques étudiés. Le projet représente un ensemble d'études types. Le nombre d'études réalisées durant la période de validité de l'autorisation dépendra du

nombre de molécules à tester. Le projet pourra comporter jusqu'à 120 études. Une étude comportera jusqu'à 140 animaux. Le nombre d'animaux par groupe est déterminé en fonction de la variabilité interindividuelle liée au comportement analysé.

A ce jour, l'animal de laboratoire reste le seul recours permettant d'étudier le comportement lié à la mémoire.

Une étude standard comprend 140 animaux répartis en 7 groupes de 20 sujets, qui reçoivent le produit testé à 4 doses, le produit mnésiant, le produit mnésiant combiné avec la molécule de référence et un placebo. Des études peuvent comprendre un nombre plus élevés ou plus faible d'animaux (par exemple pour l'étude d'un nombre de doses supérieur ou inférieur).

Le nombre total maximum d'animaux (rats ou souris) utilisées sur 5 ans est de 12000.

Respect de la règle des 3R

- Réduire. Le nombre total d'animaux utilisés pour une étude est fonction du nombre de groupes et du nombre d'animaux par groupe nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement interprétables.

- Justification du nombre de groupes. Le groupe témoin est nécessaire à chaque expérience compte tenu des variations de performances entre lots d'animaux. Le groupe produit de référence (amphétamine ou méthylphénidate) est nécessaire pour valider l'expérience et pour comparer l'efficacité du produit testé à un produit de référence. Il est généralement nécessaire de tester le produit à trois doses pour mesurer la relation dose-effet, mais un nombre de doses inférieur ou supérieur peut être justifié en fonction de l'état de connaissance du produit.

- Justification du nombre d'animaux par groupe. Compte tenu de la variabilité interindividuelle des variables mesurées dans ce test, ce nombre a été fixé à 12 animaux par groupe. L'utilisation d'un nombre inférieur d'animaux a une probabilité importante d'entraîner la non-validité de l'étude, conduisant à la refaire, et par conséquent à utiliser un nombre d'animaux plus élevé.

- Justification de la restriction alimentaire. Le test consistant à délivrer des boulettes après des réponses de l'animal, la restriction alimentaire est nécessaire pour que les animaux présentent des performances optimales de réalisation de la tâche. Cette restriction est fonction de l'âge et de l'espèce, rats ou souris. Elle est calculée de façon, à la fois, à permettre un niveau de motivation élevé pour réaliser la tâche et n'entraîner aucune détérioration de l'état physique de l'animal. Cet état physique est évalué tous les jours animal non cachétique et présentant une activité normale dans la cage d'élevage.

- Raffiner. Des animaux présentant des signes de souffrance sont euthanasiés. Outre la motivation éthique conduisant à cette euthanasie, celle-ci est requise pour des raisons expérimentales, la souffrance d'un animal biaisant les variables comportementales mesurées. L'utilisation de traitements pour pallier à cette souffrance est exclue, ces types de traitement étant susceptibles de modifier le comportement des animaux et l'action pharmacologique des produits étudiés.

- Remplacer. Il n'existe pas à ce jour de modèle n'utilisant pas d'animaux ou nécessitant un nombre plus réduit d'animaux ou ayant un degré de sévérité inférieur permettant d'obtenir des informations équivalentes à celles obtenues par le présent modèle.

14452 Le projet Le but de cette étude est de prouver la supériorité de l'activité anti-tumorale de l'Aflibercept comparativement au Bevacizumab sur des xénogreffes de cancer colorectal humain répondant à ces deux traitements. Pour cela nous souhaitons effectuer un « switch » (ou changement) d'un traitement à l'autre après 14 jours de traitement. Le modèle cellulaire sera injecté à des souris ayant perdu leur système immunitaire. Ces cellules ainsi greffées, vont développer une tumeur à l'emplacement de l'injection.

Nous avons choisi le modèle des souris nude car c'est le modèle le plus adapté pour ce genre d'étude, ces souris étant immuno-déficiente, elles ne rejettent pas les cellules humaines qui leur seront injectées.

Ces souris recevront quelques jours après l'injection des cellules tumorales, des traitements de médicament (Aflibercept ou Bevacizumab) et nous suivrons l'inhibition de la pousse tumorale au cours du temps et ainsi évaluer l'efficacité de ce médicament.

A la fin de l'étude expérimentale, les animaux seront sacrifiés, les tumeurs prélevées pour poursuivre nos recherches sur l'action de nos médicaments au niveau des voies de signalisation au sein des tumeurs prélevées.

Nous mettons tout en œuvre pour respecter la règle des 3R Réduction, Raffinement, Remplacement, en n'utilisant que la quantité minimale de souris pour avoir en final des résultats statistiquement satisfaisants (réduction). Les bonnes pratiques et les règles éthiques sont toujours respectés au cours de notre protocole et veillons à surveiller les points limites que nous nous sommes fixés (raffinement). Enfin, l'ensemble des études présentées ici ont préalablement été menées *in vitro*, cependant ces études doivent également être étudiées *in vivo* dans lequel l'environnement de la tumeur est ici pris en compte, ce qui n'est pas envisageable dans une boîte de culture cellulaire (remplacement).

Nous espérons mettre en évidence que le traitement par l'Aflibercept permettra une diminution de la croissance tumorale plus importante que le Bevacizumab (résultat déjà confirmé dans de précédentes études) et que le changement de traitements permettra une stabilisation de la croissance tumorale (Bevacizumab vers Aflibercept) ou au contraire une augmentation de la croissance (Aflibercept vers Bevacizumab).

Les animaux

* Type Souris immunodéficientes commerciales de type NMRI-Nude Foxn1, modèle couramment utilisé en cancérologie.

* Nombre : Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 75 souris expérimentales pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

La conformité au principe des 3R

*Remplacement Les études *in-vitro* déjà menées ont permis de sélectionner/affiner au mieux les conditions expérimentales du projet afin de réduire au maximum le nombre d'animaux impliqués dans cette étude. En effet, cette étude ne peut-être conduite qu'*in vivo* car celle-ci prend en considération la tumeur, son environnement ainsi que l'ensemble des interactions mise en jeu. Ainsi, il n'y a pas de modèles alternatifs au modèle animal permettant de recréer l'ensemble des acteurs impliqués dans le développement tumoral et l'action des traitements proposés. »

*Réduction Nous limitons au maximum le nombre d'animaux par groupe de façon à obtenir des résultats statistiquement fiables. A cause des variabilités inter-animales et intergroupes, un nombre trop restreint d'animaux engendrerait des résultats trop variables et non valides. Compte tenu des données de la littérature (variabilité attendue) et des effets espérés, un test de puissance statistique a été utilisé pour déterminer le nombre minimum d'animaux nécessaire pour cette étude. De plus, de précédentes études déjà effectuées nous permettent de savoir le nombre de cellules à injecter afin de réduire le nombre d'animaux.

*Raffinement Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures ont été mise au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal, en limitant la douleur et le stress (anesthésie, analgésie, etc.). Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation, les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum. Le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification ou de maison de type igloo. Nous nous efforçons à chaque instant de raffiner nos procédures afin de garantir le bien-être des animaux en cours de procédure grâce à une surveillance attentive (point limite) et des soins adaptés.

14453 Quel rôle le sommeil joue-t-il dans le renforcement des souvenirs de type émotionnel ? La formation de souvenirs associant un événement avec une émotion nécessite deux structures du cerveau l'hippocampe et l'amygdale. L'amygdale participe au traitement des émotions telles que la peur, alors que l'hippocampe traite les souvenirs épisodiques (contextualisés) et la mémoire spatiale. Le but de ce projet est de comprendre les mécanismes électrophysiologiques du dialogue entre l'hippocampe et l'amygdale pendant le sommeil qui permettent d'associer un événement (contexte) à l'émotion correspondante. Nous utiliserons des enregistrements neuronaux chez le rat pendant la formation d'un souvenir aversif, puis pendant le sommeil qui suit, afin d'établir les modalités de ce dialogue. Nous utiliserons également des outils de pointe permettant de manipuler avec de la lumière l'activité de sous-ensembles de neurones (optogénétique) pour perturber ce dialogue pendant le sommeil et mesurer l'impact de ces perturbations sur la formation de la mémoire émotionnelle (n total=146).

Ce projet se découpe en deux parties. Dans la première partie, nous utiliserons des enregistrements dans l'hippocampe couplés à des stimulations optogénétiques permettant d'activer ou d'inhiber l'amygdale. Cette expérience permet d'augmenter ou de perturber sélectivement le dialogue hippocampe-amygdale pendant le sommeil. Ceci nécessite l'injection de virus permettant l'expression de protéines spécifiques contrôlées par la lumière dans les neurones de l'amygdale. Un premier groupe d'animaux (n=20) servira à établir les paramètres idéaux (zones d'injection du virus et quantité) pour une expression correcte en localisation et en quantité, des protéines qui permettront la manipulation des neurones par la lumière. En parallèle, nous mettrons en place la tâche comportementale de formation des souvenirs émotionnels (conditionnement aversif) dans un groupe d'animaux contrôle (n=32). Enfin, nous perturberons l'activité de l'amygdale en fonction de l'activité de l'hippocampe pendant le sommeil qui suit le conditionnement aversif (n=64), et nous évaluerons les conséquences de cette perturbation sur les performances des animaux.

L'hippocampe est une structure complexe dont les parties dorsale et ventrale sont considérées comme fonctionnellement distinctes. L'hippocampe dorsal est impliqué dans la mémoire spatiale. L'hippocampe ventral est également impliqué dans l'anxiété. Il est donc crucial de comprendre comment la partie ventrale de l'hippocampe, plus directement liée à l'amygdale, interagit avec cette dernière pendant le sommeil. Nous effectuerons des enregistrements électrophysiologiques simultanés dans la partie ventrale de l'hippocampe et dans l'amygdale. Après implantation des électrodes, les animaux seront soumis à divers tests d'exploration libre ou d'apprentissage aversif léger (jet d'air). Le sommeil qui suit ces apprentissages sera enregistré et les données récoltées permettront d'analyser les interactions hippocampe-amygdale pendant le sommeil en lien avec la tâche d'exploration ou d'apprentissage qui a précédé (n=30).

Les rats constituent le modèle animal de référence pour l'étude de la mémoire spatiale et aversive. Dans l'état actuel des choses, ces études ne peuvent être simulées sur ordinateur et doivent se faire sur des animaux vivants capables d'apprentissage. Les enregistrements intracrâniens ne peuvent être effectués chez l'homme que chez des patients épileptiques dont la pathologie pourrait affecter les résultats. Le modèle rongeur apparaît donc comme idéal dans la mesure où il constitue un bon modèle mammifère pour l'étude des mécanismes fondamentaux de l'apprentissage aversif.

Pour limiter autant que possible le nombre de rats requis pour ce travail, nous utiliserons des technologies d'enregistrements de pointe permettant d'échantillonner les réponses de dizaines de neurones simultanément, à la fois aux niveaux hippocampique et amygdaliens, dans le but de maximiser l'information obtenue pour chaque rat. Les chirurgies se feront en conformité avec la réglementation (anesthésie et antalgie appropriées); les légères restrictions hydriques nécessaires à la motivation des animaux feront l'objet d'un suivi méticuleux (surveillance quotidienne, alimentation à volonté dès que la diminution du poids dépasse 15%); les éléments aversifs (choc des pattes, jet d'air) seront ajustés pour générer un stress minimal. Les manifestations de stress en dehors des périodes d'apprentissage et de test seront particulièrement surveillées.

Nombre total d'animaux utilisés 146

14454 Il existe de nombreuses pathologies humaines provoquant des déformations de la colonne vertébrale, comme la scoliose idiopathique (1-3% de la population), dont l'origine est de nos jours encore insuffisamment comprise. L'étude de ces pathologies requiert l'usage d'animaux car la morphogenèse à l'échelle du corps entier ne peut se récapituler dans des modèles cellulaires *in vitro*. Les poissons-zèbres sont des modèles animaux souvent utilisés en recherche du fait de leur caractère maniable et à reproduction rapide, mais aussi de l'absence de quadrupédie, qui rend le modèle plus exact que pour d'autres vertébrés utilisés en recherche (souris, mouton etc...). Utiliser ce modèle évite des interventions chirurgicales invasives réalisées chez les mammifères pour provoquer des scolioses, car une simple mutation génétique récapitule des symptômes d'anomalies de courbure proches de celles observées chez l'humain. Toutes les séances d'imagerie peuvent être réalisées sous anesthésie générale, en surveillant que les animaux ont un battement cardiaque et flux sanguin normal. Les expériences de comportement seront réalisées après habituation dans l'arène dans une grande quantité d'eau du système, et l'observation continue du poisson permettra de détecter tous signes de souffrance (comportement de détresse avec nage de fuite ou absence de mouvements). Plus spécifiquement, des poissons-zèbres mutants pour des gènes contrôlant la fonction ciliaire entre autres, présentent des déformations vertébrales. Nous aimerions analyser l'origine des déformations de type cyphose et scoliose, afin de voir si ces poissons pourraient être un modèle d'étude pertinent pour ces pathologies conduisant à des déformations de la colonne vertébrale. Notre projet consiste à utiliser 1539 poissons pour 1) la réalisation d'un micro-scanner, afin de décrire plus précisément les défauts au sein de la colonne vertébrale chez ces modèles et comparer leur évolution à celle de la pathologie humaine 2) l'investigation des causes développementales des torsions de la colonne par l'analyse de défaut du développement au niveau musculaire, spinal ou de la notochorde pouvant être responsables de torsions du squelette axial – une analyse morphologique sera accompagnée du suivi de l'activité calcique des mêmes types cellulaires 3) l'analyse de la posture et des comportements locomoteurs de ces animaux aux stades précoces de la pathologie. Les analyses statistiques utilisées, basées sur le Generalised Linear Model (GLM), permettent d'intégrer des facteurs confondants (sexe, jour d'expérimentation, fond génétique...) et ainsi d'augmenter notre puissance statistique pour un nombre d'animaux donné, garantissant une exploitation des résultats optimale en minimisant le nombre d'animaux utilisés.

14455 L'arthrose, dans le contexte d'une population vieillissante, a un impact majeur sur la qualité de vie des patients et constitue un véritable problème de santé publique dans les pays occidentaux. L'arthrose se caractérise par une dégradation progressive des articulations, se traduisant principalement par des douleurs et une limitation fonctionnelle, atteignant l'ensemble des structures de l'articulation, telles que le cartilage, les ligaments, et le ménisque. Les progrès menés dans la compréhension de l'arthrose ont permis d'identifier des cibles thérapeutiques prometteuses visant à prévenir ou à ralentir la progression de la maladie. Mais malgré d'intenses recherches dans ce domaine, aucune approche pharmacologique n'a démontré d'efficacité thérapeutique. A ce jour, le seul critère d'évaluation de cette efficacité reste le temps écoulé avant le remplacement total de l'articulation par chirurgie. Il apparaît que la recherche et le développement de thérapies efficaces sont limités par le manque d'outils d'imagerie sensibles et spécifiques permettant la quantification réelle de la progression de l'arthrose et l'évaluation de la réponse thérapeutique.

Dans ce contexte, ce projet fait suite à la validation d'une nouvelle approche de ciblage du cartilage par imagerie moléculaire *in vivo*, qui permettra d'aboutir à une méthode non invasive d'imagerie fonctionnelle des articulations en médecine nucléaire. La stratégie de ciblage, développée et validée dans notre laboratoire depuis plusieurs années, couverte par un brevet mondial, vise à valider une approche innovante de prise en charge des patients souffrant d'arthrose. Cette stratégie dédiée à l'imagerie du cartilage se base sur l'utilisation d'un agent bi-fonctionnel (le [99mTc]-NTP-15-5) qui contient une fonction ammonium quaternaire pour le ciblage des protéoglycanes, et un complexe technétié, le Technétium 99m étant un isotope de choix pour l'exploration en médecine nucléaire. Sur la base de nombreuses études précliniques, nous pensons qu'un tel radiotraceur est un sérieux candidat pour une imagerie sensible et fonctionnelle du cartilage à l'échelle des protéoglycanes : sa sensibilité et sa spécificité permettront de quantifier des critères fonctionnels au niveau du cartilage, permettant ainsi à la fois une évaluation des signes précoces de la pathologie et de

l'efficacité des nouvelles approches thérapeutiques. Afin de démontrer cette hypothèse, notre projet a été soumis avec succès à l'Agence Nationale pour la Recherche (ANR) dans la cadre des appels à projets génériques 2015.

Aujourd'hui, nous disposons d'un traceur équivalent ([⁶⁴Cu]-NTP-15-5) marqué au Cuivre 64, isotopes adapté à l'imagerie TEP (Tomographie par Emission de Positons), un technologie d'imagerie sensible et quantitative largement utilisée dans les services de Médecine Nucléaire. Nos résultats préliminaires avec ce traceur chez le rat et le lapin montre une distribution encore plus favorable que celle observée jusqu'ici avec le [^{99m}Tc]-NTP-15-5. Notre objectif est, dans le cadre du présent projet, d'évaluer en TEP la distribution de ce traceur chez la souris saine et porteuse d'arthrose, et de comparer ces résultats avec ceux précédemment obtenus avec le technétium 99m. Le nombre d'animaux inclus dans ce projet a été optimisé conformément à la règle des 3R est de 30 sur 5 années.

Ce nombre a été calculé afin de garantir une valeur statistique à l'étude menée.

En effet, de nombreuses études *in vitro* réalisées en amont ont permis de remplacer l'utilisation des animaux. Cependant, ces études sur cellules ne peuvent pas se substituer aux études sur un organisme entier afin d'évaluer les effets potentiellement indésirables sur d'autres organes d'une nouvelle molécule diagnostique.

Au cours de ce projet, le nombre d'animaux nécessaire est réduit au maximum en sélectionnant uniquement les expérimentations essentielles. L'utilisation et la validation de nouvelles techniques d'imageries permettent également de réduire le nombre d'animaux.

La surveillance quotidienne des animaux permettra de déceler les premiers signaux de stress, de douleurs ou d'inconfort pour l'animal qui pourront être améliorés par l'administration d'antalgiques (Rimadyl, 5 mg/Kg, administration quotidienne par voie sous-cutanée, pendant 5 jours au maximum) avant l'atteinte des points limites définis. Les conditions d'hébergement seront optimisées (portoirs ventilés, température, hygrométrie, luminosité, densité animale, enrichissement de milieu avec coton pour la nidification, bâtonnet de bois pour ronger et cabane de cachette).

IMPORTANT : l'établissement du modèle d'arthrose qui sera fourni pour ce projet a déjà fait l'objet d'une notification de décision favorable de la part du Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche en date du 12/11/2015 et référencée sous le numéro 04623.02.

14456 Le projet se focalise sur la validation d'une méthode de radiomarquage à l'iode 131 de l'hypericine afin d'obtenir un radiopharmaceutique thérapeutique potentiellement utilisable en clinique.

Le processus thérapeutique de cette méthode repose sur une stratégie en deux étapes pour le traitement des tumeurs solides :

1) cibler les vaisseaux sanguins de la tumeur (qui lui apportent les nutriments nécessaires à sa croissance) en administrant un agent anti-tubuline, un agent rompant la vasculature (ou "vascular disrupting agent (VDA), entraînant ainsi une nécrose dans la masse interne de la tumeur.

2) administrer un composé avide de nécrose (ou NAC, Necrosis Avid Compound) comportant un émetteur radioactif, iodo-hypericin ([¹³¹I]-I-Hyp), qui va cibler la tumeur nécrosée :

- L'énergie radioactive délivrée par le [¹³¹I]-I-Hyp détruit les cellules tumorales résiduelles à la surface de la tumeur, cellules qui n'étaient pas dépendantes du système vasculaire tumoral.

- De plus, l'imagerie nucléaire peut également être utilisée afin de monitorer la réponse thérapeutique au traitement de cette stratégie.

A ce stade, le développement de ce radiotraceur pour une application clinique implique une méthode de synthèse et son automatisation par le biais d'un automate de synthèse dit "AllInOne". La validation de cette méthodologie automatisée est l'objet du présent projet.

Pour ce faire, l'objectif de cette étude va être de comparer le comportement biologique de l'iodo-hypericine marquée à l'iode 131 soit par la méthode conventionnelle, soit par la méthode automatisée qui sera celle utilisée in fine en clinique. De fait, la formulation de la molécule ainsi obtenue sera différente des formulations utilisées dans les études précédentes. Cette nouvelle

formulation doit être testée chez le rat, sur un modèle de nécrose hépatique, la nécrose tissulaire étant le site ciblé par la molécule, en suivant une méthodologie similaire à ce qui déjà fait l'objet d'une étude européenne publiée par l'équipe responsable de ce projet en 2014.

Les procédures impliquées dans ce projet seront réalisées sur un modèle de rat présentant une nécrose hépatique dans un des lobes du foie. Ce modèle a déjà fait l'objet de nombreuses publications. Les animaux recevront une injection intraveineuse de iodo-hypéricine radiomarquée à l'iode 131 afin d'en déterminer la distribution biologique dans le temps, avec l'une ou l'autre des méthodes de synthèse.

Ces expériences seront réalisées dans le respect de la règle des 3R (Remplacer, Réduire et Raffiner), utilisant des conditions de stabulation, de bien-être animal et un nombre de rats optimisés. Une observation journalière des animaux est assurée par la personne chargée de l'expérimentation. Cette observation consiste à vérifier l'état et le comportement général des rats. Si l'animal montre des signes de souffrance importants, traduisant des troubles en rapport avec l'expérimentation (perte de poids supérieure à 20%, prostration, hérissément du poil), il est mis à mort et une autopsie est pratiquée immédiatement afin d'en déterminer la cause et éventuellement de prélever des organes.

Lors des procédures expérimentales, les rats seront placés sous anesthésie générale afin d'éliminer toute douleur potentielle et de réduire l'angoisse générée par la manipulation.

La surveillance quotidienne des animaux permettra de déceler les premiers signaux de stress, de douleurs ou d'inconfort pour l'animal qui pourront être améliorés par l'administration d'antalgiques (Rimadyl 20 mg/kg par jour en sous cutanée pendant 5 jours maximum) avant l'atteinte des points limites définis. Les conditions d'hébergement seront optimisées (portoirs ventilés, température, hygrométrie, luminosité, densité animale, enrichissement de milieu avec coton pour la nidification, bâtonnet de bois pour ronger et cabane de cachette).

L'ensemble du projet comprendra 24 rats. Le nombre d'animaux inclus dans ce projet a été optimisé conformément à la règle des 3R.

Ce nombre a été calculé afin de garantir une valeur statistique à l'étude menée. En effet, de nombreuses études *in vitro* réalisées en amont on permet de remplacer l'utilisation des animaux. Cependant, ces études sur cellules ne peuvent pas se substituer aux études sur un organisme entier afin d'évaluer les effets potentiellement indésirables sur d'autres organes d'une nouvelle thérapie/molécule diagnostique. Au cours de ce projet, le nombre d'animaux nécessaire est réduit au maximum en sélectionnant uniquement les expérimentations essentielles. De plus, l'utilisation et la validation de nouvelles techniques d'imageries permettent également de réduire le nombre d'animaux.

Au final ce projet devrait permettre de valider une méthodologie de production d'un radiopharmaceutique thérapeutique utilisable chez l'homme, dans les services de médecine nucléaire.

14457 Les mammites sont des infections bactériennes de la mamelle chez les ruminants et sont un problème majeur de la filière laitière à cause d'une altération de la qualité du lait et d'une augmentation des coûts de production. Cette pathologie peut toucher entre 5 et 10 % des animaux d'un élevage. Ces infections entraînent une utilisation importante d'antibiotiques avec des résultats faibles et aboutissent souvent à la mort ou à une réforme prématurée des animaux contaminés. En complément des mesures d'hygiène comme le soin apporté au moment de la traite ou l'état sanitaire du paillage dans les étables, il est prévu de recourir à une sélection génétique pour augmenter l'immunité vis-à-vis des infections mammaires et la résistance globale aux mammites. Cependant, les principaux gènes et mécanismes qui contrôlent la prédisposition aux mammites ne sont pas connus.

Une mutation ponctuelle dans le gène SOCS-2 a été identifiée chez des brebis de race Lacaune comme étant fortement liée à l'apparition de mammites mais aussi à une augmentation de la taille et de la production laitière et ces avantages expliquent pourquoi cette mutation a été largement sélectionnée dans les élevages. Les effets de cette mutation montrent que SOCS2 pourrait donc

agir à la fois sur une augmentation de la production laitière, sur la croissance mais aussi sur l'immunité et sur la prédisposition négative aux infections bactériennes.

Etant donné la complexité physiologique de la glande mammaire, il n'existe actuellement pas de modèle cellulaire *in vitro* de cet organe. De ce fait, l'objectif du projet est d'étudier les mécanismes de prédisposition aux infections bactériennes en présence de la mutation trouvée dans le gène SOCS-2 en dehors de toute autre variation génétique chez des animaux mis à la reproduction. Pour cela, nous avons choisi de modifier de manière ciblée le gène SOCS2 d'animaux résistants aux mammites et de déterminer ainsi si la mutation identifiée peut expliquer à elle seule la sensibilité aux mammites.

Le projet débouchera sur de nouvelles connaissances applicables en sélection génétique pour l'amélioration de la santé des animaux, mais aussi de nouvelles connaissances sur les mécanismes de régulation des réponses immunes et inflammatoires. A l'échelle d'un troupeau de brebis, une description précise de l'apparition de mammites en relation avec le gène SOCS-2 muté sera réalisée ainsi qu'une évaluation de la production laitière. Les effets bénéfiques ou négatifs de cette mutation sur les objectifs de production laitière seront analysés, et une stratégie pour la gestion future de la mutation dans la population de brebis de race Lacaune sera mise en place.

Nous désirons obtenir 5 à 6 agnelles porteuses de la mutation dans le gène SOCS2 afin de comparer l'apparition de mammites éventuelles chez ces animaux par rapport à des animaux naturellement sensibles aux mammites après mise à la reproduction et pendant la lactation. Ce nombre d'animaux a été choisi afin de réduire le temps nécessaire à l'obtention de données statistiques si toutes les brebis ne sont pas gestantes en même temps.

Nous utiliserons pour ce projet 30 brebis de race Lacaune résistantes aux mammites sur lesquelles seront pratiquées des ponctions ovariennes par endoscopie et sous anesthésie générale afin d'obtenir des embryons par fécondation *in vitro*. Dans le but de réduire le nombre d'animaux utilisés pour ce protocole, nous doserons l'hormone AMH dans le sang des brebis donneuses afin de ne sélectionner que quinze brebis avec un fort potentiel à la production d'ovocytes. Après modification génétique, le transfert de deux ou trois embryons porteurs de la mutation d'intérêt du gène SOCS2 sera effectué dans des brebis de race Romane. La race Romane a été sélectionnée car elle permet d'avoir des gestations multiples jusqu'à 3 ou 4 petits par portée. Cette race de brebis nous permettra ainsi de réduire le nombre de femelles receveuses nécessaires au projet pour atteindre notre objectif de 5 à 6 animaux porteurs de la mutation d'intérêt. Nous envisageons d'avoir besoin de 30 brebis de race romane pour ce projet. En effet, la manipulation préalable d'embryons *in vitro* diminue la probabilité d'obtenir une gestation à terme et un rendement de 10 à 20% d'embryons transférés donnant un petit à la naissance est une base statistique courante.

Notre projet nécessite donc l'utilisation de 60 animaux répartis en 2 groupes de 30 donneuses et 30 receveuses d'embryons. Les animaux de race Lacaune et de race Romane sélectionnés proviennent d'élevages de brebis utilisées pour la recherche. Ils seront hébergés par groupe de 6 animaux afin de respecter leurs besoins d'animal grégaire.

Tous les animaux seront élevés dans des bâtiments neufs agréés et suivis par des personnels qualifiés, dont un vétérinaire, à même de détecter toute anomalie comportementale ou symptomatique des animaux. Ces personnels pourront apporter immédiatement les soins nécessaires pour le maintien d'une qualité de vie optimale et réduire toute apparition de gêne ou de détresse chez un animal. Ce suivi sera particulièrement important lors des phases de récupération après les ponctions ovariennes ou les transferts d'embryons.

En fin de projet, les donneuses d'ovocytes pourront être placées, après un contrôle vétérinaire, par une association de protection animale qui gère la réhabilitation des animaux de laboratoire.

14458 Toute perturbation environnementale induit une réaction physiologique au niveau hormonal. Modifier les niveaux hormonaux des oiseaux sauvages est donc une approche novatrice permettant de tester l'impact de perturbations imprévisibles le plus souvent induites par l'homme. Chez les oies migratrices, la condition corporelle au printemps et son engraissement déterminent en grande partie sa reproduction (production des œufs) en été. Des perturbations rencontrées durant cette période

pourront donc avoir des conséquences sur la condition corporelle, mais aussi des impacts négatifs sur la reproduction. L'objectif de cette étude est de comprendre les mécanismes comportementaux et physiologiques mis en jeu durant la période d'engraissement. Nous souhaitons valider l'effet d'une augmentation transitoire des taux d'hormones impliquées dans le métabolisme sur le comportement alimentaire et la masse corporelle sur des oies en captivité. Nous proposons d'observer des groupes d'oies cendrées issues d'élevage et maintenues en semi-captivité. Des études antérieures chez d'autres espèces montrent qu'une élévation transitoire des taux de corticostérone à faible dose stimule l'alimentation alors qu'une augmentation des taux de ghréline réduit la prise alimentaire. Nous souhaitons vérifier ces effets chez l'oie cendrée avant de mettre en place ces manipulations en nature. Lors de la phase 1, trois groupes de sept oies seront munis d'implants sous cutanés diffusant de la corticostérone, un placebo ou recevront des injections quotidiennes de ghréline (hormone simulant la satiété chez les oiseaux). Les mêmes individus étant utilisés dans les deux phases, un minimum de trois mois de repos entre la phase 1 et la phase 2 sera respecté. La phase 2 visera à utiliser des mini-pompes sous cutanées afin de contrôler la diffusion d'ACTH (hormone précurseur de la corticostérone) ou de ghréline. Les individus deviennent alors leurs propres contrôles ce qui permet de réduire le nombre d'individus utilisés. 4 mâles (uniquement utilisés pour définir la dose d'ACTH) et 10 femelles seront alors nécessaires.

Les mêmes individus étant utilisés dans les deux phases, un minimum de trois mois de repos entre la phase 1 et la phase 2 sera respecté. Pour l'ensemble des phases, des prélèvements sanguins seront récoltés un jour sur deux afin de doser les taux hormonaux et ainsi valider que nos traitements modifient les niveaux de base des hormones ciblées (ghréline et corticostérone). Les oies cendrées seront pesées avant l'implantation et ensuite quotidiennement pour vérifier des changements de masse corporelle. La fréquence et la durée d'alimentation sera mesurée par des observations comportementales quotidiennes. La règle des 3 R sera appliquée selon les modalités suivantes

Remplacement : Cette manipulation est une validation expérimentale réalisée sur une espèce domestique : l'oie cendrée en captivité avant de transposer ces manipulations sur des espèces sauvages migratrices. L'utilisation d'animaux ne peut être remplacée dans ce cas.

Réduction : Les individus constituent leurs propres contrôles ce qui réduit le nombre d'individus utilisés.

Raffinement : Nous proposons d'observer des groupes d'oies cendrées issues d'élevage et maintenues en semi-captivité dans un enclos de 1000 m². Deux sites d'alimentation et deux bassins (Suffisamment grandes pour permettre une immersion complète lors des comportements de toilette) permettent de limiter les interactions agonistiques.

Une injection locale de lidocaïne sera appliquée afin d'anesthésier la zone avant incision. L'implant sera inséré et l'incision refermée à l'aide d'un point de suture. Nos suivis de la masse corporelle et comportementaux permettront d'établir rapidement l'état de santé des animaux. Il est difficile d'établir le niveau de douleur ou de souffrance chez les oiseaux et nous ne prévoyons pas d'utiliser d'analgésiques. En revanche, si la source d'inconfort dans notre expérimentation provient des implants (ou pompes) sous-cutanés, ceux-ci seront immédiatement retirés par une incision réalisée sous anesthésie locale. L'individu sera alors retiré de l'expérience et placé en isolement par rapport au groupe le temps que le problème se résorbe. Toutes les opérations chirurgicales seront réalisées par un vétérinaire.

14459 L'athérosclérose est l'une des principales causes de mortalité dans les pays industrialisés. Cette maladie est à l'origine de la plupart des maladies cardiovasculaires. Elle se caractérise par une accumulation de cholestérol dans la paroi des vaisseaux qui aboutit à l'obstruction partielle ou totale des artères, gêne le fonctionnement du cœur et conduit à la "crise cardiaque" ou aux accidents vasculaires cérébraux (AVC). Le cholestérol s'accumule dans deux types cellulaires les cellules des parois des vaisseaux, les cellules musculaires lisses (CML) et des cellules du système immunitaire qui infiltrent la paroi des vaisseaux, les macrophages. Une protéine circulante appelée "Wnt5a"

limite l'accumulation du cholestérol. Une autre protéine, Frizzled (F) empêche l'utilisation par les cellules de Wnt5a, ce qui diminue son effet bénéfique sur l'athérosclérose.

L'objet de ce projet est l'identification des mécanismes par lesquels Wnt5a contrôle le devenir du cholestérol dans la CML de la paroi des vaisseaux, de diminuer l'accumulation du cholestérol par deux moyens en augmentant la quantité de Wnt5a dans les macrophages ou en augmentant la biodisponibilité de Wnt5a par injection d'un anticorps contre F et protéger ainsi contre les maladies cardiovasculaires.

Nous utiliserons des souris génétiquement modifiées dont les cellules musculaires des vaisseaux sanguins sont dépourvues de Wnt5a ou qui en exprime très peu et des souris qui expriment beaucoup de cette protéine dans les macrophages. Nous confirmerons chez l'animal adulte, le rôle protecteur de Wnt5a en donnant aux souris un régime riche en cholestérol qui aboutira à la formation de lésions d'athérosclérose. Nous confirmerons qu'en augmentant la biodisponibilité de Wnt5a nous diminuons la survenue des lésions d'athérosclérose.

Avec ces modèles animaux nous pourrions étudier les mécanismes contrôlant l'accumulation du cholestérol dans les vaisseaux de l'organisme entier et développer une thérapie pour limiter cette accumulation à l'aide d'un anticorps anti sFRP2. Entre la création des souris génétiquement modifiées, le maintien en élevage et les souris qui seront utilisées en expérimentation, nous utiliserons 812 animaux au maximum sur 5 ans. Ce nombre a été déterminé afin d'obtenir des résultats statistiquement exploitables.

Remplacement : Le modèle animal est, pour le moment, le seul modèle qui permet d'étudier dans son ensemble les phénomènes complexes mis en œuvre dans l'athérosclérose. En effet cette atteinte est multifactorielle et nécessite un grand nombre d'acteurs comme les cellules de l'immunité, les particules de cholestérol circulantes (les LDL ou mauvais cholestérol), les globules rouges. Toutes ces conditions ne sont pas reproductibles fidèlement dans un modèle de culture cellulaire. Nous utiliserons au maximum les cellules en culture de type musculaire lisse vasculaire humaine (lignée cellulaire) pour approfondir les résultats obtenus sur les animaux et étudier certains mécanismes liés à l'utilisation du cholestérol par les cellules.

Réduction : Le nombre d'animaux a été déterminé pour pouvoir obtenir des résultats statistiquement exploitables. Si nous arrivons à mettre en évidence un mécanisme d'action de Wnt5a rapidement, nous n'utiliserons pas le nombre total d'animaux demandé (672 animaux sur 5 ans au total).

Nous utiliserons également nos souris afin de faire des cultures de cellules musculaires de vaisseaux sanguins et de cellules cardiaques, dans le but d'identifier les mécanismes cellulaires par lesquels Wnt5a protège de l'accumulation du cholestérol. La partie « culture de cellules » permettra de limiter le nombre d'animaux nécessaire à notre étude.

Raffiner : Nous mettrons en place différents points limites dans notre expérimentation pour atténuer la gêne de nos animaux liée au régime riche en cholestérol que nous leur donnerons ces points limites sont définis en tenant compte de l'aspect et du comportement des animaux au cours du régime. Pendant la phase de régime, les animaux seront 3 à 5 dans les cages, avec des enrichissements sous forme de morceaux de bois pour que les animaux usent leurs dents et un carré de coton qu'ils pourront utiliser pour confectionner leur nid. Le suivi de l'état des animaux sera quotidien.

14460 Chez les mammifères, les milliards de bactéries hébergées dans l'intestin, et qui composent le microbiote intestinal, établissent avec leur hôte des interactions réciproques sous contrôle d'un système immunitaire intestinal extrêmement complexe. Comprendre comment le système immunitaire de l'hôte contrôle le partenariat hôte/bactéries représente un enjeu majeur avec de nombreuses implications en physiologie et pathologie et, actuellement, aucune autre approche que celle sur animal vivant ne permet d'envisager reproduire et analyser ce réseau d'interactions.

L'utilisation de souris gnotobiotiques (souris nées et élevées sous conditions stériles, en isolateur, puis colonisées avec des bactéries individuelles ou des microbiotes plus ou moins complexes) nous a permis de mettre en évidence qu'une bactérie particulière, la bactérie segmentée filamenteuse (SFB), joue un rôle majeur dans la maturation post-natale du système immunitaire intestinal.

Comment la SFB exerce ses propriétés immuno-stimulatrices exceptionnelles tout en maintenant l'homéostasie intestinale, et comment cette bactérie s'adapte à son environnement intestinal sont des questions non complètement élucidées auxquelles nous désirons répondre.

Notre projet est basé sur l'utilisation de souris axéniques (dépourvues de germes), maintenues en isolateur. 2884 souris seront nécessaires au projet.

Dans un premier volet, nous étudierons les interactions entre la bactérie SFB et le système immunitaire de l'hôte. Pour étudier les mécanismes du dialogue hôte/SFB, nous comparerons des souris sauvages ou génétiquement modifiées, colonisées par SFB durant une ou trois semaines.

Dans un deuxième volet, nous testerons l'effet combiné, ou non, du régime et de l'environnement bactérien du tube digestif sur l'adaptabilité de la SFB à son environnement. Des souris sauvages adultes seront ainsi monocolonisées par SFB ou co-colonisées par SFB et d'autres bactéries non pathogènes pour la souris. Les souris seront soumises à 4 types de régimes différents (riches en graisses ou en fibres), soit sur une période courte, soit sur une période longue.

Pour ces deux volets, en fin d'expérience, les souris seront euthanasiées pour prélèvement d'organes afin d'analyser les réponses immunes.

En complément du second volet, nous souhaitons tester un moyen de sélection *in vivo* de SFB recombinantes, porteuses d'un marqueur d'antibiorésistance. Des souris axéniques seront colonisées par SFB à l'âge adulte puis recevront, ou non, des doses variables d'antibiotiques n'induisant pas de phénotype dommageable chez la souris. Des fèces des animaux seront collectées tous les 2 jours afin d'y quantifier la SFB et ainsi déterminer la dose minimale d'antibiotique requise pour la sélection. En fin de traitement, les souris seront euthanasiées.

Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux sera réduit au minimum. Bien que le maintien des souris en isolateurs soit sans conséquence pour leur bien-être, les souris seront soumises à une surveillance régulière. Pour limiter la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, gavages et injections seront réalisés par du personnel expérimenté ayant l'habitude de travailler en isolateur. Néanmoins, en cas de nécessité, une mise à mort anticipée de l'animal sera effectuée. Par ailleurs, quand cela s'avèrera possible, des alternatives à l'utilisation d'animaux vivants, telles que des essais *in vitro* sur organoïdes ou lignées cellulaires, seront utilisées.

A terme, les résultats de ce projet permettront de comprendre comment la SFB s'adapte à l'environnement intestinal et d'envisager l'utilisation de cette bactérie, ou des voies utilisées par cette bactérie, pour stimuler les réponses immunes chez l'homme.

14461 Les déficits dans le traitement et le comportement sensoriel sont associés aux maladies neurologiques et neuropsychiatriques humaines incluant l'autisme, la schizophrénie, les crises d'angoisse et dépressions. Une meilleure compréhension des mécanismes fondamentaux du développement et plasticité des systèmes sensorielles et cognitives post-naissance pourrait donc conduire à une nouvelle approche thérapeutique, plus performante pour l'homme. Pour cela, nous étudions la régulation des mécanismes de plasticité cognitive dans le cerveau.

Nous utilisons le système visuel des souris comme modèle, car les souris sont génétiquement très connues et assez proche de l'homme. Pour altérer l'activité de certains neurones, nous allons changer le niveau d'expression de certaines protéines dans leur cerveau par injection précis de molécules ou de virus. Nous utiliserons ces tissus pour analyses histologiques et biochimiques afin d'évaluer les effets sur la stabilité génomique des neurones. Ces interventions nécessitent des procédures de classes modérées.

Ces sont des mécanismes beaucoup trop complexes qui ne peuvent être étudiés par de simples systèmes de cultures. Pour répondre à ces questions, il faut un cerveau complet d'un organisme modèle tel que la souris. Les conditions expérimentales nécessitent au minimum 10 souris par condition pour avoir des résultats statistiquement valables. Les procédures ont été optimisées (utilisation des mâles et femelles) afin de minimiser le nombre d'animaux, qui sera au maximum 600.

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. Les souris sont hébergées dans des conditions enrichies pour leurs bien-être. Pour toutes nos expériences, les souris sont anesthésiées selon les bonnes pratiques vétérinaires. Les points limites sont décrits pour chaque procédure. Les souris sont hébergées dans une animalerie nouvellement rénovée. Elles sont sous contrôle de la température et de la lumière (en cycle jour/nuit). Elles bénéficient de l'équipement complet pour leur bien-être (cotons pour leur nid, nourriture et eau libre d'accès, nourriture plus riche si besoin). Les visites pour veiller à leur bien-être sont journalières. Les animaux seront utilisés uniquement pour ce projet.

Ce projet nous permettra de mieux comprendre la régulation des mécanismes de plasticité cognitive dans le cerveau.

14462 Les maladies cardiovasculaires représentent la première cause de mortalité dans le monde, aussi bien dans les pays développés que dans ceux en voie de développement. L'incidence de la mortalité cardiovasculaire augmente avec les facteurs de risque cardiovasculaire, au premier plan desquels l'hypertension, le diabète et l'athérosclérose. L'athérosclérose est associée à un remodelage de la paroi des artères qui entraîne un rétrécissement de la lumière et in fine une obstruction par agrégation des plaquettes sanguines et coagulation du sang, on parle d'athérombose. La prise en charge des patients consiste d'une part à diminuer les facteurs de risques associés au développement de l'athérosclérose (diabète, hypertension) et souvent, lorsque la pathologie est avancée, à procéder à une angioplastie. Cette procédure consiste à introduire un ballonnet dans la lumière de l'artère puis à le gonfler pour réouvrir le vaisseau. Secondairement, une endoprothèse vasculaire (stent) métallique peut être posée pour maintenir l'artère ouverte et assurer la perfusion sanguine des tissus. La limitation principale de cette procédure est la resténose qui consiste en un épaissement réactionnel de la paroi artérielle qui va à long terme ré obstruer la lumière du vaisseau. Ce phénomène est causé par la destruction par érosion des cellules endothéliales qui bordent la surface luminale des vaisseaux et à la prolifération secondaire des cellules musculaires lisses qui constituent la paroi artérielle. Les mécanismes à l'origine de la resténose post angioplastie ne sont pas totalement élucidés.

Une récente étude clinique a montré qu'un nouveau traitement antidiabétique par des inhibiteurs des transporteurs sodium glucose (SGLT2) pouvait diminuer de 38 % le risque d'un premier évènement cardiovasculaire chez des patients atteints d'un diabète de type 2. La même étude clinique a montré une forte réduction (35%) du nombre d'hospitalisation pour insuffisance cardiaque, indiquant que cette molécule aurait un fort effet protecteur sur le système cardiovasculaire. Toutefois, les effets protecteurs de ce traitement vis-à-vis du système cardiovasculaire ne peuvent pas s'expliquer par le seul effet antidiabétique relativement faible, suggérant un possible effet protecteur direct de la molécule sur les vaisseaux sanguins et le cœur.

Le but du présent projet est donc d'évaluer l'effet d'un nouvel antidiabétique oral sur la resténose dans un modèle d'angioplastie (non lié au diabète).

Le nombre maximal d'animaux utilisés pour ce projet est de 74 rats du fait de l'application de la règle des 3R. Le remplacement du modèle animal par un autre modèle n'est pas possible du fait que les altérations vasculaires et cardiaques sont des processus complexes issus des interactions multi-tissulaires dans l'organisme. La réduction des effectifs est liée à l'utilisation de techniques et d'approches statistiques adaptées (ANOVA et/ou test non-paramétriques). Enfin, le raffinement se fait par une prise en compte du bien-être animal (enrichissement du milieu et soins quotidiens aux animaux) et par l'utilisation d'anesthésiques, d'antalgiques et de soins péri- et post-opératoires adaptés.

14463 La coagulation est une cascade de réaction enzymatique dont le produit final est la génération de thrombine qui va cliver le fibrinogène, une protéine du sang, en un réseau insoluble de fibrine. Dans des conditions physiologiques, la fibrine se forme au niveau d'un agrégat plaquettaire et permet de le stabiliser pour éviter des hémorragies. Un processus similaire peut se produire dans un vaisseau

malade et conduire à une thrombose veineuse. Cette pathologie entraîne une morbidité très importante en France et dans le monde.

Des agents anticoagulants sont développés depuis de nombreuses années et utilisés dans la prévention et le traitement des thromboses. Ces agents sont très efficaces mais présentent des effets secondaires comme le risque hémorragique. L'objectif de cette étude est d'évaluer de nouveaux anticoagulants en hémostase et en thrombose afin de déterminer s'ils peuvent représenter de nouveaux agents anticoagulants avec moins de risque hémorragique.

Limitation du nombre d'animaux

Remplacement : Le but de ce projet est d'évaluer l'effet de nouveaux anticoagulants en thrombose expérimentale. Dans le cadre de cette étude, il est impossible de substituer la souris à d'autres modèles, car les modèles *in vitro* ne permettraient pas de reproduire une thrombose telle qu'elle se forme chez l'homme.

Réduction : Le nombre d'animaux utilisés lors de cette étude est réduit au minimum, ce nombre étant fixé à 16 souris/groupe au maximum pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs.

Raffinement : L'utilisation de modèles d'animaux a été établie en raffinant au maximum les conditions de travail, afin de limiter leur angoisse, stress et douleur lors des manipulations. Pour ce faire, des points limites ont été établis pour les procédures décrites. Ces points limites permettront de soustraire l'animal aux procédures expérimentales permettant de limiter la souffrance et l'inconfort de l'animal.

Pour assurer leur confort, les animaux sont hébergés dans des cages munies de particules de bois et enrichies avec un carré en coton compressé et de frisure de papier, afin de permettre aux animaux de réaliser un nid et de compartimenter leur environnement conformément à leurs besoins comportementaux.

Pour chaque procédure, les animaux sont anesthésiés, maintenus à une température de 38°C par l'utilisation d'une plaque chauffante (tout au long de la procédure) et un traitement approprié contre la douleur leur est administré.

Pendant toutes les expérimentations, les animaux sont surveillés par du personnel entraîné.

Cette étude nécessitera l'utilisation de 640 souris.

14464 La schistosomiase est une maladie causée par un ver parasite sanguin qui touche plus de 230 millions de personnes, en particulier en Afrique subsaharienne, mais qui s'est récemment étendue à la Corse, probablement en raison du réchauffement climatique et des mouvements de population. En plus de causer une mortalité importante, cette maladie chronique provoque une anémie, un retard de croissance et une performance scolaire réduite chez les enfants : elle contribue de manière importante à la pauvreté et à la réduction de la durée de vie des populations touchées.

Le traitement et le contrôle de la schistosomiase sont effectués par l'administration en masse du seul médicament disponible, le Praziquantel. Bien que cela ait été efficace pour réduire l'impact de la maladie, des traitements répétitifs sont nécessaires, en raison de la réinfection et de l'apparition de régions où le médicament s'avère moins efficace. Ceci souligne la nécessité de trouver de nouveaux médicaments pour compléter et/ou remplacer le Praziquantel. Parmi les nombreuses approches explorées pour développer de tels médicaments, la réutilisation de médicaments existants, qu'ils soient approuvés ou en cours d'essais cliniques, est particulièrement prometteuse.

Dans ce contexte, nous avons découvert qu'un médicament en cours d'essais cliniques pour le traitement de la maladie d'Alzheimer (maintenant en phase 2) tue efficacement les schistosomes en culture. Nous proposons donc de tester ses effets *in vivo* et d'évaluer sa possible utilisation en association avec le Praziquantel. De cette manière, nous espérons développer un nouveau traitement de la schistosomiase qui permettra d'améliorer l'efficacité et le contrôle de la maladie.

Ce composé seul ou en association avec le praziquantel sera d'abord testé au préalable *in vitro* sur des parasites maintenus en culture (schistosomes et vers adultes). L'ensemble de ces expériences, réalisées *in vitro*, nous permettra de sélectionner les composés les plus prometteurs afin de réduire le nombre d'animaux utilisés ainsi que de palier l'apparition de toxicité sévère lors

de leur utilisation *in vivo*. Cependant, le modèle animal ne peut être remplacé par ces différents tests. En effet, aucune technique de culture *in vitro* ne permet le développement des schistosomules en vers adulte. De plus, il a été montré que la réponse immunitaire de l'hôte, joue un rôle important dans l'action thérapeutique des composés à visée anti schistosome. Ainsi l'utilisation d'un modèle murin au cours de ce projet s'avère incontournable pour identifier de nouveaux candidats médicaments.

Dans ce projet, nous estimons le nombre maximum de souris utilisées à 1440. Ce nombre d'animaux pourra être réduit au cours du projet, en fonction du nombre de concentrations différentes de composé à tester sur la période des 5 ans. Dans le but de veiller au bien-être animal et dans un souci de raffinement de nos expériences, nous avons décidé de stopper nos études 45 jours après l'infestation puisque qu'au-delà, celle-ci et les pathologies associées induisent des douleurs et des souffrances chez l'animal qui sont dues notamment à la ponte des œufs ainsi qu'à leur rétention dans les tissus. Pour finir, au cours de l'infestation, les animaux seront suivis quotidiennement et ceux manifestant des signes de souffrance et de mort très proche seront mis à mort immédiatement.

14465 Le projet Les cellules cancéreuses se distinguent des cellules normales par l'accumulation de mutations dans leur génome. Ce phénomène est plus au moins important selon le type de tumeurs. Nous sommes intéressés à l'étude du cancer du colon de type MSI (pour Microsatellite instable). Ces cancers surviennent à la suite de l'inactivation du système de réparation de l'ADN appelé MMR, normalement responsable de la réparation des erreurs produites pendant la réplication de l'ADN. Il est connu que les cancers de type MSI sont de meilleur pronostic par rapport aux tumeurs de type non MSI (ou MSS pour Microsatellite Stable) caractérisés par des mutations dans la structure des chromosomes (instabilité chromosomique).

L'objectif de ce projet est d'étudier les conséquences de l'inactivation du système MMR spécifiquement dans l'épithélium colique pour pouvoir investiguer par la suite le rôle de différentes mutations sur le développement des cancers coliques MSI en présence et/ou en absence d'un traitement qui induit une augmentation des lésions cancéreuses.

Les animaux

* Type Lignée murine transgénique sur fond FVB/n permettant d'étudier spécifiquement l'inactivation du système MMR spécifiquement dans l'épithélium colique qui constitue le cœur de ce projet.

* Nombre : Ce projet impliquera l'utilisation de 240 souris transgéniques au maximum pour une durée de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment. Il repose sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 « règle des 3 R ». Les questions scientifiques posées au sein de ce projet ne peuvent être abordées qu'à travers l'étude d'organisme vivant dans leur ensemble. Le nombre d'animaux requis a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

La conformité au principe des 3R

*Remplacement Un système vivant est nécessaire pour étudier les acteurs mis en jeu dans le développement tumoral qui est au cœur de ce projet. Il n'est pas possible de recréer *in vitro* la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs cellulaires rentrant en jeu.

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

*Raffinement Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures a été mis au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation, les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum. Le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification ou de maison de type igloo. Nous

nous efforçons à chaque instant de raffiner nos procédures afin de garantir le bien-être des animaux en cours de procédure grâce à une surveillance attentive (point limite) et des soins adaptés.

14466 Les traumatismes sévères ou les résections de tumeurs peuvent endommager les nerfs périphériques et limiter la sensibilité et la mobilité. Des études ont montré que des biomatériaux à base de polysaccharides ont des propriétés hémostatiques mais la régénération de nerfs périphériques n'a pas été démontrée. L'objectif de ce projet est d'évaluer l'efficacité de nouveaux biomatériaux dans le processus de régénération nerveuse chez le rat. Les biomatériaux seront appliqués sur la lésion nerveuse et les plans musculaires et cutanés refermés. 15 minutes avant la procédure chirurgicale, une analgésie sera effectuée par injection de buprénorphine (Voie sous-cutanée, 0.05mg/kg). En post-opératoire, les animaux recevront également des injections d'analgésique et seront surveillés pendant 5 jours. L'étude se déroulera sur 8 semaines et la régénération nerveuse sera étudiée par des méthodes histologiques. Un test de puissance statistique démontre que le nombre optimal d'animaux doit être de n=10/groupe. Au total 40 rats pourront être utilisés pour 4 groupes. Cette expérimentation est réalisée en respectant le principe des 3R : il n'existe pas de méthode alternative à l'expérimentation animale pour évaluer la régénération de nerfs périphériques, étape pré clinique indispensable avant des essais chez l'homme, le nombre d'animaux est réduit au maximum en tenant compte de la variabilité inter individus. Le raffinement est assuré par la gestion de la douleur post-opératoire, la définition de points limites. De plus, durant la chirurgie, les animaux seront placés sous anesthésie générale gazeuse après administration d'un analgésique afin de prévenir des événements douloureux post-opératoires. Cette administration analgésique sera répétée pendant les 3 jours suivant l'opération, à raison de 2 fois par jour si des signes de douleurs sont constatés lors du suivi. Les animaux seront hébergés par 2 sur une litière en copeaux de bois et un tube en carton pour l'enrichissement du milieu.

14467 La mission de notre centre de recherche est de mettre au point des aliments destinés à l'alimentation des truies en gestation et en lactation. Au cours de nos essais, nos principales mesures sont d'ordre zootechnique consommation d'aliments, évolution du poids, évolution de l'état corporel et suivi sanitaire. Afin d'approfondir nos essais, nous sommes parfois amenés à réaliser des prélèvements sanguins sur les truies et les porcelets pour compléter nos mesures classiques et pour évaluer l'impact de la nutrition sur plusieurs métabolismes (reproduction, santé, immunité, ...). Les interactions complexes entre métabolismes ne permettent pas d'utiliser de méthodes alternatives à la prise de sang veineux périphérique accessible par ponction cutanée. Ces prises de sang sont réalisées sur des truies et des porcelets comme dans un élevage terrain classique qui effectuerait une prophylaxie. La procédure est de classe légère puisque le volume prélevé est très faible pour les truies (<1% du volume sanguin par prélèvement) et faible pour les porcelets (<8%). La durée de la prise de sang est très rapide du fait du très faible volume prélevé. Dans ce projet de 5 ans, 2200 truies sont concernées et 14000 porcelets. Mais les prises de sang sont réalisées sur un échantillon limité d'animaux déterminé par une analyse statistique préalable. Ainsi des prises de sang seront effectuées sur 1200 truies et 1200 porcelets sur les 5 ans. Pour les truies, le nombre de prélèvements réalisé sur chaque animal est en moyenne 2 fois /an avec un maximum de 4 fois /an. Pour les porcelets sous la mère, c'est maximum 2 fois / an avec un intervalle minimum de 2 semaines.

La contention est réduite au minimum nécessaire pour effectuer le prélèvement sanguin dans les conditions de sécurité pour l'animal et les opérateurs. Toutes mesures sont prises pour limiter la peur et la douleur des animaux faisant l'objet des prélèvements et de leurs congénères.

Pendant le prélèvement, en fonction de signes cliniques notables ou sévères, le prélèvement de sang est arrêté et l'animal peut être sorti de l'essai.

Les animaux sont aussi observés particulièrement pendant les 2 jours qui suivent la prise de sang. En présence d'un signe clinique notable, le protocole de soin de l'élevage est appliqué. En présence d'un signe clinique sévère, l'animal est mis en hors essai et le protocole de soin de l'élevage est appliqué.

A la fin de chaque essai, les truies et les porcelets continuent leur cycle d'élevage classique.

14468 Récemment, le fardeau mondial du paludisme a diminué grâce à différents programmes de prévention et de lutte contre les vecteurs. Toutefois, en 2017, près de 219 millions de personnes ont été infectées et le nombre de décès dus au paludisme a été estimé à 435 000. A l'heure actuelle, aucun vaccin n'est disponible contre les différents agents causals du paludisme et, en dehors de la lutte contre les vecteurs, sa prévention et son traitement reposent principalement sur les médicaments antipaludiques. Or, l'apparition de résistances à l'artémisinine et ses dérivés (derniers antipaludiques mis sur le marché et recommandés par l'Organisation Mondiale de la Santé) ayant été observée, la recherche portant sur le développement de nouvelles molécules antipaludiques demeure indispensable.

Dans cette optique, plusieurs dérivés de la famille de molécules des aminopyridine-méthanol (APM) ont été synthétisés. L'évaluation *in vitro* de leurs activités antipaludiques, cytotoxicité, mutagénicité, propriétés pharmacocinétiques ainsi que l'évaluation *in vivo* de leur toxicité aiguë sur souris Balb/c ByJ a été effectuée. Les 5 molécules les plus prometteuses au regard de leur potentiel thérapeutique ont ainsi pu être sélectionnées bon index thérapeutique (rapport activité antipaludique/toxicité) et doses compatibles à une administration chez l'homme afin d'évaluer *in vivo* leur activité antipaludique dans le modèle murin (Balb/c ByJ) d'infection à *Plasmodium berghei* ANKA (souche murine de paludisme pour les rongeurs). En effet, si les étapes préalables *in vitro* et *in vivo* nous ont permis de présélectionner les molécules d'intérêt et donc de minimiser le nombre d'animaux à utiliser, il n'est pas actuellement possible de se passer d'une évaluation de l'activité antipaludique des molécules sur un organisme entier.

Les protocoles expérimentaux présentés dans le projet ont été construits en respectant la règle des 3R. Une réduction du nombre d'animaux utilisés a été privilégiée en ne considérant que l'effectif absolument nécessaire pour évaluer l'activité antipaludique des 5 molécules sélectionnées suite à l'étude de toxicité aiguë. Ainsi, le nombre de souris nécessaire a été évalué à 128. Les tests de toxicité aiguë ayant été réalisés sur des souris femelles (plus sensibles à la toxicité que les mâles), les tests d'efficacité le seront également.

Les molécules seront injectées quotidiennement par voie intrapéritonéale aux souris impaludées pendant 5 jours. Les souris traitées seront observées et leur état général enregistré quotidiennement pendant 30 jours. L'évolution de la parasitémie sera évaluée quotidiennement pendant 5 jours puis tous les deux jours. Des points limites adaptés ont été définis (taux de parasitémie, perte de poids importante, signes de souffrance) et seront relevés dans une grille d'évaluation lors du suivi au minimum quotidien des animaux.

Une réduction du nombre d'animaux utilisés a été privilégiée en tenant compte des biais propres à l'expérimentation et en considérant l'effectif nécessaire d'après le calcul des tailles d'effectif requis pour une exploitation statistique des résultats satisfaisante. Nous avons pris soin de choisir une lignée de souris homogène et bien documentée dans le cadre des essais de pharmacothérapie antipaludique.

Tout au long de l'expérimentation, la vie en groupe sera privilégiée. Une attention particulière sera portée à l'enrichissement de l'environnement des rongeurs, par la mise en place d'abris et d'éléments à ronger, de manière à limiter l'anxiété des animaux. Les souris auront accès ad libitum à la nourriture et à la boisson. La stratégie de remplacement n'est pas possible à cette étape du projet, les différentes études *in vitro* et *in vivo* ayant été menées préalablement avec des résultats intéressants et concluants. A ce stade, le recours à l'expérimentation animale est essentiel pour confirmer l'efficacité antipaludique des molécules. En effet, le remplacement par une méthode alternative n'est pas envisageable car l'efficacité des anti-infectieux est liée à leurs propriétés pharmacodynamiques/pharmacocinétiques. Les modèles murins et primates de paludisme sont les plus pertinents pour cette étude. Il est donc prévu d'évaluer l'activité antipaludique *in vivo* sur le modèle murin BALB/c ByJ, pour lequel la physiopathologie pour le paludisme généré par la souche

de *Plasmodium berghei* ANKA est bien décrite. Le choix du modèle murin BALB/c ByJ repose sur notre maîtrise du modèle d'infection chez ce rongeur.

14469 Le cancer colorectal(CRC) est le 3ème cancer au niveau mondial. Au cours du CRC, la tumeur primaire a la capacité de s'étendre et de disséminer dans les organes distants pour former des métastases, essentiellement dans le foie. Les thérapies actuelles du CRC consistent en la résection de la tumeur primaire et potentiellement de la métastase, suivie d'une chimiothérapie, contenant du 5-Fluoruracil(5-FU), combinée ou non à des thérapies ciblées. Le pronostic de survie des patients dépend de nombreux facteurs dont le stade du CRC au moment du diagnostic. En effet, 25% de patients sont diagnostiqués au stade métastatique et 25% de patients diagnostiqués à un stade local non invasif sont susceptibles de développer des métastases hépatiques. L'efficacité des traitements actuels contre les métastases reste faible, avec un taux de mortalité de 89% observé 5ans après le diagnostic chez des patients au stade métastatique. Les métastases dans le CRC constituent actuellement un défi majeur à surmonter en oncologie.

Plusieurs données cliniques ainsi que nos récents travaux sur des modèles orthotopiques d'oncologie précliniques démontrent, dans plusieurs types de cancers, que la tumeur primaire peut impacter la progression et la résistance aux thérapies des métastases associées. Par ailleurs, nous avons montré en préclinique que le microenvironnement des tumeurs primaires de colon se polarise spontanément vers un biais pro ou anti-tumoral, initiant par la suite respectivement la progression (dans 30% des animaux) versus le rejet des CRC (dans 70% des animaux). Le microenvironnement est constitué de cellules et molécules entourant les cellules tumorales, y compris les lymphocytes T cytotoxiques, exerçant les fonctions anti-tumorales majeures. Nos données préliminaires établissent que quand une communication inter-tumeurs s'établit, c'est le microenvironnement immun anti-tumoral du colon qui peut agir à distance et modifier le microenvironnement des métastases hépatiques.

Nous avons également effectué de nombreux tests *in vitro* sur des tumeurs et du sang provenant de patients atteints de cancers épithéliaux divers. Nos résultats démontrent que les lymphocytes T cytotoxiques spécifiques de tumeurs(TILs) expriment à leur surface une ou plusieurs molécules « points de contrôle » ou « checkpoint » (en particulier PD-1, TIGIT, TIM-3 et CTLA-4) qui semblent déterminantes pour le devenir des tumeurs, y compris les tumeurs de CRC.

Notre étude vise à mieux comprendre la communication inter-tumeurs possiblement établie dans le CRCm ainsi que la capacité des checkpoints à inhiber la réponse immunitaire anti-tumorale. Nous pourrions ainsi identifier de nouvelles cibles thérapeutiques dans un cancer pour lequel la métastase reste bien souvent incurable chez les patients. Les études sur la communication inter-tumeurs impliquant la totalité du microenvironnement immun, sur le rôle des TILs et l'expression des checkpoints à leur surface, ainsi que les tests de combinaisons de chimio/immunothérapies (en particulier immune checkpoint blockers : ICB) ne peuvent se faire que dans un modèle d'étude reproduisant la complexité de la tumeur et de son microenvironnement. Nous utiliserons des souris BALB/c, c57Black6(B6) WT ou génétiquement modifiées immunocompétentes et des souris dépourvues de système immunitaire NOD/SCID et Nude comme modèles d'études. Nous développerons des modèles murins orthotopiques multi-tumeurs représentatifs du CRCm. Nous implanterons des lignées tumorales murines de CRC, de cancer du foie et de mélanome (comme contrôle), dans différentes localisations anatomiques en orthotopique seulement dans le colon (site primaire) (procédure1), dans le foie (site métastase) (procédure2) ou en sous-cutanée (SC)(procédure3) ainsi que simultanément dans plusieurs de ces localisations (procédures4 à 6). Ces implantations de cellules tumorales directement dans leur site d'origine sont favorables à la reconstitution du microenvironnement immun spécifique à chaque tissu.

Afin de réduire le nombre d'animaux en expérimentation, une étude complète de la littérature actuelle concernant notre projet a été effectuée pour ne pas reproduire des résultats d'expériences déjà effectuées sur des animaux. Par ailleurs, nous utiliserons des tests statistiques (t-student, 2way ANOVA, Mann Whitney) afin de valider nos résultats et limiter le nombre d'expériences à effectuer à 3, réduisant ainsi le nombre d'animaux. Le nombre total de souris utilisées sur 5ans sera de 7980souris. Nous utiliserons soit des lots de 20animaux/groupe-

procédures^{1,4,5} soit 13 animaux/groupe-procédure², soit 8 animaux/groupe-procédures^{3,6} afin de garantir une signification statistique (chapitre 3.4.10).

L'évolution du cancer dans les modèles précliniques (traités ou non) sera suivie par des mesures de volume des tumeurs SC à l'aide d'un pied à coulisse, ainsi que de l'imagerie *in vivo* par bioluminescence pour les tumeurs localisées en profondeur (IC, IH) (procédure 7). Afin de raffiner la méthodologie utilisée, nous porterons une attention particulière à la souffrance et au stress des animaux ainsi qu'à l'atteinte du point limite. Le suivi de l'état général des souris sera effectué quotidiennement par le porteur de projet (Niveau 1) et du personnel formé. Pour diminuer la souffrance liée aux procédures expérimentales et au développement du cancer, un traitement analgésique sera donné dans l'eau de boisson. Pour diminuer le stress des animaux, les conditions d'hébergement seront améliorées avec l'ajout de complément alimentaire riche et sucré et des injections intrapéritonéales de sérum physiologique si une déshydratation est observée. L'angoisse et la souffrance seront évaluées par des observations comportementales. Si un changement chez l'animal traduit un point limite décrit au chapitre 3.3.5, l'animal sera euthanasié, en accord avec le vétérinaire désigné.

14470 Le thème général du projet porte sur l'effet délétère d'une alimentation déséquilibrée sur la mémoire. Une alimentation trop riche en gras et en sucre augmente le risque de problèmes cognitifs comme la mémoire. La période d'adolescence est particulièrement sensible à ce type d'alimentation car le cerveau est encore en maturation. Les conséquences de difficultés de mémoire chez les adolescents sont importantes car elles vont impacter la performance scolaire et influencer la mémoire pour toute la vie. Il est donc important de comprendre la vulnérabilité spécifique à l'adolescence. Le travail chez le rongeur est complémentaire des travaux cliniques car nous travaillons dans des conditions très contrôlées par rapport à l'alimentation et les conditions de vie en général. De plus, des analyses moléculaires ou pharmacologiques au niveau des régions cérébrales sont possibles chez l'animal. Les études comportementales de mémoire couplées à des régimes gras et sucrés ne peuvent se faire que sur des mammifères, il est donc impossible de remplacer ces expériences par des analyses *in vitro*. Tout cela augmente considérablement les chances de découvrir les mécanismes biologiques impliqués.

Dans ce projet nous nous intéressons à la chrononutrition, c'est-à-dire aux périodes de la journée où les animaux mangent. En effet, les rongeurs, comme les humains, mangent principalement pendant leur période active et ne mangent pas dans la période de repos dédiée au sommeil. Cependant, avec une alimentation grasse et sucrée disponible à tout moment (*ad libitum*), les rongeurs, comme les humains, perdent ce rythme jour/nuit. Or, cette perte de rythme jour/nuit dans l'alimentation est responsable en grande partie des problèmes d'obésité et aussi des troubles de mémoire. Nous voulons maintenant examiner les mécanismes moléculaires impliqués dans ces effets.

Une étude préliminaire chez la souris suggère que le récepteur aux hormones glucocorticoïdes (GR) joue un rôle clé dans ces processus car en bloquant ce récepteur par une drogue injectée en intrapéritonéal nous prévenons les troubles de mémoire. Dans ce nouveau projet nous voulons vérifier que l'action du GR se situe bien au niveau de l'hippocampe, une région cérébrale sollicitée dans le type de mémoire que nous étudions. Pour cela nous devons infuser la drogue localement dans l'hippocampe via des canules implantées dans chaque hémisphère cérébral puis mesurer les performances de mémoire des souris grâce à des analyses comportementales. Comme ce récepteur GR est aussi un facteur qui induit de nombreux gènes en aval, nous voulons mesurer cette activité d'induction de gènes *in vivo* spécifiquement dans l'hippocampe. Pour cela, nous infusions dans l'hippocampe un virus « reporter » contenant une séquence ADN induite par le GR couplée à un fluorophore qui permet de suivre l'induction de cette séquence "reporter" par une fibre optique implantée au même endroit. L'implantation de canules, de fibre optique ou l'injection de virus recombinant dans l'hippocampe de souris sont des approches bien maîtrisées dans notre laboratoire, nous avons tous les équipements (poste de sécurité microbiologique, matelas chauffant, poste d'anesthésie gazeuse au masque) et un protocole de médication précis pour minimiser la souffrance des souris.

Ensuite, nous voulons identifier les gènes de l'hippocampe qui sont induits durant l'apprentissage d'une tâche de mémoire chez des souris nourries à un régime contrôle par rapport à des souris nourries à un régime gras et sucré donné ad libitum ou seulement dans la période active. Pour cela, les souris des différents groupes expérimentaux seront soumises à l'apprentissage d'une tâche de mémoire et seront euthanasiées soit 1h après pour identifier les gènes induit rapidement (gènes dit précoces) soit 12 h après pour identifier les gènes induits plus tardivement. Nous voulons faire ces expériences matin et soir, étant donné l'importance de la période de prise de nourriture comme évoqué plus haut. Ces expériences ne comportent que peu de souffrance pour les animaux, excepté des prélèvements de sang et une mesure en RMN pour la mesure de la masse grasse selon le type d'alimentation. Ces analyses apportent des informations indispensables au suivi des animaux lors des expérimentations ainsi qu'à l'analyse globale des données.

Une fiche de suivi opératoire est remplie pour chaque souris opérée et soumise au comité de suivi du bien-être animal du laboratoire. Des scores de douleur ou d'inconfort sont donnés à chaque visite des animaux suivis. Selon ces scores l'animal est mis à l'isolement pendant 24-48h et traité si besoin ou euthanasié immédiatement si le score est élevé ou si aucune amélioration n'est observée après 48h.

L'avantage de ces approches *in vivo* est la précision sur la région cérébrale analysée et les acteurs moléculaires identifiés. Ces mesures intégrées sur les animaux élevés dans des conditions très contrôlées fournissent des résultats robustes pour comprendre et ainsi mieux traiter les problèmes cognitifs liés à une alimentation déséquilibrée.

Nous utiliserons 282 souris au total, le nombre de souris a été réduit au minimum afin de pouvoir faire des analyses statistiques robustes. Pour les études comportementales, 12 souris par groupe sont nécessaires alors que pour l'analyse de gènes 6 par groupe suffisent. Pour réduire le nombre de souris, plusieurs tests comportementaux sont réalisés sur les mêmes souris. Pour raffiner les expérimentations, plusieurs mesures sont prises : les souris sont hébergées en groupe de 5 avec des enrichissements variés (maison, barre à ronger); elles sont manipulées quotidiennement avant les tests comportementaux afin de les habituer à l'expérimentateur et ainsi de réduire le stress; au sacrifice les animaux seront anesthésiés pour qu'il n'y ait pas de souffrance. De nombreux tissus sont prélevés outre la région cérébrale d'intérêt. Ces tissus sont conservés au congélateur pour l'utilisation dans d'autres projets.

14471 L'objectif principal de notre plateforme est de développer de nouveaux traitements contre le cancer. Nous disposons de différents vecteurs (Anticorps, affitines, liposomes, etc...) et de plusieurs radioéléments (Astate 211, Iode 131, zirconium, Yttrium 90 Scandium 47, cuivre 64 etc...), certains connus qui servent de références et des nouveaux.

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. 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.

Deux types de modèles seront utilisés par injection de cellules tumorales chez le rongeur. Ces deux procédures permettent de réaliser les premiers tests d'efficacité d'une molécule en cours de développement sur un modèle animal simple, à savoir l'injection sous-cutanée de cellules tumorales de souris chez la souris immunocompétente (modèles syngéniques) et de cellules tumorales humaines chez la souris immunodéprimée (xénogreffes) Nous réalisons des images de ces souris par différentes méthodes (bioluminescence, PET-Scan, PET-IRM) avant et après les radio-immunothérapies vectorisées qui nous permettent de mesurer l'efficacité du traitement et sa toxicité sur les tissus sains.

Selon notre historique, nous estimons mener 5 études par an, soit 25 études sur 5 ans. Sachant que 30 à 70 animaux sont utilisés par étude, nous estimons que 1750 souris seront utilisées au maximum sur 5 ans. En tant que plateforme, nous réalisons des prestations de services. Par conséquent, nous sommes amenés à travailler sur différentes souches de souris, mais dont le phénotype ne sera pas dommageable.

Nos études seront planifiées pour respecter au mieux la règle des 3R pour Remplacer la pathologie cancéreuse étant une pathologie complexe, il n'existe pas à ce jour de méthodes alternatives à l'expérimentation animale. Toutefois, les principes actifs seront préalablement testés *in vitro* afin de réduire le nombre de candidats à tester *in vivo* en excluant les candidats les moins prometteurs. Réduire pour chaque étude, le nombre d'animaux utilisés est réduit à un minimum acceptable pour l'obtention d'informations robustes et statistiquement pertinentes. Raffiner l'apport de l'imagerie permet d'une part de raffiner les modèles animaux existants et d'autre part de développer et proposer des modèles *in vivo* toujours plus proches des situations cliniques. Les animaux seront hébergés selon la réglementation en vigueur avec un enrichissement du milieu. L'état général et clinique des animaux sera surveillé de façon quotidienne pour estimer une éventuelle gêne ou douleur. L'évaluation journalière permettra la mise en place et l'ajustement de traitements analgésiques.

14472 L'activité métabolique élevée dans le système nerveux central (SNC) nécessite un système efficace de drainage afin de se débarrasser des molécules toxiques qui sont produites au cours de l'activité neuronale. Dans notre corps, le système lymphatique accomplit cette tâche de nettoyage des tissus, mais comment le SNC est nettoyé reste très peu connu. Les méninges sont des membranes qui entourent le SNC et servent à le séparer physiquement de l'extérieur afin de le protéger, et récemment, un système lymphatique fonctionnel a été découvert dans les méninges. Une diminution de la capacité de drainage par ces vaisseaux lymphatiques dans les méninges a été montrée dans des conditions de vieillissement et de physiopathologie telle que la maladie d'Alzheimer. Dans les régions internes du cerveau des vaisseaux lymphatiques n'ont jamais été montrés. Nous avons réalisé des études préliminaires qui montrent que des marqueurs lymphatiques se trouvent dans ces régions internes, nous incitant à examiner la possibilité que des mécanismes lymphatiques y existent. Ce projet a pour objectifs de déterminer, aux niveaux anatomique et moléculaire, la présence de telles structures lymphatiques, et de les localiser à l'intérieur du cerveau chez la souris. Cela constituerait une découverte majeure dans les domaines de la biologie, anatomie et médecine, et permettrait des avancées thérapeutiques notamment dans le cadre des pathologies cérébrales neurodégénératives ou tumorales. Nous voulons étudier comment ces structures évoluent pendant le vieillissement et dans un modèle physiopathologique, notamment celui de la maladie d'Alzheimer, par des méthodes non invasives sur des tissus "post mortem".

Afin de protéger les animaux de laboratoire, nous avons appliqué le principe de 3R comme suit : (1) Remplacement : le système lymphatique dans les méninges a été découvert chez la souris. Les études *in vitro*, sur animaux invertébrés ou vertébrés telle que le poisson zèbre ne permettent pas l'étude de ce système puisqu'il n'existe pas chez ces modèles. Donc, pour notre projet nous avons choisi le modèle de la souris qui représente un bon compromis d'étude et cela permet de ne pas utiliser de primates. (2) Réduction le nombre d'animaux utilisés est réduit au minimum pour nous permettre de générer des données statistiques solides. Le nombre d'animaux est calculé pour obtenir, le cas échéant, un résultat statistique significatif avec $\alpha=0.05$. Nous utiliserons sur 4 ans un total de 330 souris. (3) Raffinement Les souris seront hébergées dans des cages aux normes avec à disposition des formes d'enrichissement (coton de nidification) afin de réduire le stress, et seront suivies régulièrement pour observer leur état. Nous utiliserons une seule procédure de classe sans réveil, ce qui permettra de réduire au minimum le stress et la douleur des animaux au cours de la procédure.

14473 Ce projet repose sur un apprentissage entièrement basé sur la pratique expérimentale permettant aux apprenants d'acquérir les notions clés de la physiologie animale. En effet, comprendre les

processus physiologiques nécessite à la fois d'acquérir des connaissances à différents niveaux d'organisation (du gène jusqu'à l'organisme entier) et de comprendre les interactions entre les grands systèmes régissant le fonctionnement de l'organisme (respiration, circulation, métabolisme, etc). La démarche expérimentale est une approche idéale pour initier les apprenants à cette complexité car à partir d'une seule question, il est possible d'aborder ces différents aspects. Dans ce contexte il est proposé aux apprenants concernés par cet apprentissage de réaliser un mini-projet sur 4 jours au cours desquels ils étudient expérimentalement l'adaptation métabolique au jeûne chez la souris. Ce projet ne comprend qu'une seule procédure d'expérimentation animale légère et non invasive qui consistera à mesurer la consommation d'O₂ et la production de CO₂ chez des souris à jeun et contrôles. Ces mesures permettent de connaître le quotient respiratoire (rapport du volume de CO₂ expiré sur le volume d'O₂ consommé dans le même temps) et ainsi d'en déduire la source énergétique préférentiellement utilisée en fonction de l'état nutritionnel des animaux (lipides vs glucides). Cette procédure est complétée par des approches biochimiques utilisant du sang et des tissus prélevés sur ces mêmes animaux après euthanasie. A l'issue de la phase pratique, les apprenants produisent un rapport qui sera évalué, décrivant les méthodes et résultats obtenus ainsi que leur interprétation. L'approche expérimentale ne peut pour l'instant pas être remplacée par des logiciels de simulation numérique car ces derniers décrivent uniquement les processus à l'échelle tissulaire et cellulaire et ne tiennent pas compte des connexions existantes entre les différents organes au sein d'un organisme. Ces logiciels sont encore trop peu performants. A ce jour, il n'existe pas de matériel pédagogique permettant la pratique d'une expérience physiologique à l'échelle de l'organisme entier autre que l'animal vivant. Cet enseignement permettra aux apprenants d'acquérir des compétences en termes de concepts de physiologie intégrative, d'expérimentation animale (y compris l'éthique), de traitement et d'analyse des données, de travail en équipe, de rédaction de protocoles et de rapport.

Dans un souci de raffinement, les animaux seront mis en présence du système de mesure de la consommation d'O₂ et production de CO₂ le jour avant la réalisation des mesures et afin de limiter le stress induit par le transfert de l'animal dans le système, le transfert se fera à l'aide du mini tunnel contenu dans la cage d'hébergement de la souris. Le mini tunnel sera ensuite retiré du système une fois que l'animal sera sorti de lui-même. Concernant la réduction, les apprenants travailleront en binômes et utiliseront un seul animal, ce qui sur 5 ans, conduira à l'utilisation de 150 animaux fournis par un organisme agréé.

14474 Le vieillissement est un facteur de risque pour les maladies chroniques telles que l'insuffisance cardiaque, un problème majeur de santé publique dans les pays occidentaux. En France, la prévalence est estimée à 2,3% de la population adulte et ce chiffre atteint 17,4% chez les sujets de plus de 85 ans. L'insuffisance cardiaque (IC) du sujet âgé est caractérisée le plus souvent par un défaut de remplissage du cœur, ce qui a conduit à la dénomination d'IC à fraction d'éjection préservée (ICFEP). Les patients avec une ICFEP présentent de multiples comorbidités : hypertension, maladies coronaires, diabète ou amylose cardiaque. Alors que l'incidence de l'ICFEP en terme de mortalité augmente constamment, les traitements demeurent inefficaces en raison d'une méconnaissance des mécanismes du vieillissement cardiaque.

Au cours des dernières années, plusieurs études ont suggéré que l'accumulation des cellules sénescents avec l'âge pourrait favoriser la survenue de l'ICFEP. Cela a conduit à l'idée selon laquelle le ciblage spécifique des voies de sénescence dans le cœur pourrait contrer le développement de l'IC liée à l'âge. Nos recherches actuelles visent donc à tester de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles dans des modèles *in vivo* afin de contrer les effets délétères du vieillissement cardiaque. Nous utilisons pour cela différents modèles murins qui miment le vieillissement physiologique et pathologique. Les différentes étiologies humaines de l'ICFEP peuvent être reproduites chez l'animal par modification génétique (vieillissement accéléré) ou par certains traitements pharmacologiques. Cette approche permet de tester plus rapidement nos hypothèses sur la pertinence de la cible. L'utilisation de ces modèles est nécessaire pour reproduire dans un système intégré les différentes composantes de la pathologie humaine. Ceci est un gage d'une meilleure transposition vers la clinique dont le besoin de nouveaux traitements est urgent.

Lors des études et dans un souci de réduction, nous nous limiterons aux seules expériences indispensables et chaque animal sera utilisé pour mesurer plusieurs caractéristiques (physiologiques, anatomiques, histologiques, biochimiques et moléculaires) du développement de la pathologie. Compte-tenu de la variabilité de ces mesures, pour chaque cible testée et pour chaque modèle, une vingtaine de souris est utilisée par groupe qui sont 2 groupes sans induction de la pathologie, avec ou sans la modification génétique (ou pharmacologique, s'il y a lieu) et 2 groupes avec pathologie, avec ou sans la modification. Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet sera estimé à 850 (détails des calculs dans les sections de chaque procédure). Dans un souci de raffinement, nous allons veiller au bien-être des animaux qui seront élevés en milieu enrichi pour pouvoir composer une litière, avec libre accès à l'eau et à la nourriture. Afin de limiter au maximum la douleur et la souffrance liées aux procédures expérimentales, celles-ci seront réalisées sous anesthésiants et analgésiques, qui seront prolongés dans la phase post-opératoire. De plus, les souris seront surveillées quotidiennement pour évaluer les signes de souffrance, détresse ou inconfort. Ce suivi comporte une évaluation de la perte de poids, de l'apparence physique et du comportement de l'animal. Un point limite est clairement établie à partir d'un seuil observé qui déclenchera l'arrêt de l'expérience et la mise à mort des animaux.

14475 L'immunothérapie consiste à traiter le cancer en utilisant notre propre système de défense, le système immunitaire. Plusieurs stratégies d'immunothérapie sont envisageables. L'une d'entre elle consiste à « éduquer » certaines cellules immunitaires du patient, les lymphocytes T, afin qu'elles reconnaissent spécifiquement les cellules tumorales et s'attaquent à elles. Pour ce faire, les lymphocytes T sont modifiés génétiquement, afin d'être dotés d'un récepteur leur permettant de reconnaître spécifiquement les cellules tumorales qu'elles peuvent ensuite tuer. Au cours de ces dernières années, il y a eu un intérêt accru pour l'optimisation de cette technologie afin d'en faire un traitement cliniquement réalisable. Des traitements expérimentaux exploitant ces cellules modifiées, ou cellules CAR-T, ont fait l'objet d'essais cliniques surtout dans le domaine des cancers du sang (leucémie ou lymphome), avec à la clé, des résultats parfois très impressionnants.

Pour mener à bien ce projet, nous mettrons dans un premier temps en place un modèle de souris développant une leucémie ou un lymphome (injection par voie intraveineuse de cellules tumorales humaines de leucémie ou de lymphome à des souris dépourvues de système immunitaire, évitant ainsi le rejet de greffe). Nous injecterons ensuite nos cellules modifiées (administrées une seule fois par voie intraveineuse). Toutes les injections par voie intraveineuse sont réalisées sur souris éveillées dans la veine de la queue. Le suivi de l'efficacité thérapeutique du traitement sera évalué par imagerie *in vivo* (les souris sont anesthésiées). Ce suivi sera réalisé une fois par semaine pendant toute la durée de l'étude (maximum 6 mois). Nous réaliserons également des prélèvements de sang au niveau de la veine de la joue sur souris éveillées 7 jours après le traitement puis le jour de l'euthanasie des animaux.

Les expériences utilisant ce modèle animal proposées vont permettre d'identifier de nouveaux mécanismes anti-tumoraux et de nouvelles méthodes de traitement qui seront directement applicables dans le domaine d'immunothérapie des cancers.

Nous nous engageons à respecter la démarche éthique européenne appliquée à l'expérimentation animale dite « règle des 3 R » comme suit

Nous avons réalisé le maximum d'expériences *in vitro* afin de valider l'efficacité de nos cellules modifiées. Néanmoins, il est nécessaire de vérifier ces résultats dans un modèle *in vivo* intégrant la plupart des caractéristiques de ces pathologies humaines telles que l'hétérogénéité des cellules tumorales, l'existence de tissus sains, la présence de barrière limitant l'efficacité des traitements. Par conséquent, les réponses anti-tumorales seront analysées chez des souris immunodéprimées avec des tumeurs humaines et injectées avec des cellules modifiées artificiellement en laboratoire.

Nous avons réduit le nombre de souris utilisé au minimum nécessaire et suffisant pour valider scientifiquement notre étude du point de vue de l'analyse statistique. Ce projet nécessitera donc l'utilisation de 1200 souris au maximum, sur une durée de 5 ans. Nous comparerons plusieurs groupes de souris (5 souris par groupe, expérience reproduite 3 fois pour s'assurer de la pertinence

des résultats) afin de déterminer la dose optimale de cellules modifiées à injecter pour avoir un effet thérapeutique persistant dans le temps.

Une attention toute particulière sera portée au bien-être des animaux par une surveillance journalière assurée par le personnel de l'animalerie et les expérimentateurs. Nous veillerons, par ailleurs, à réduire au minimum l'intensité et la durée des souffrances ressenties par les animaux, en utilisant une grille d'évaluation prenant en compte l'apparence physique, le poids et le comportement des animaux. Les souris présentant des souffrances (atteinte du point limite) seront euthanasiées. Le suivi des souris en expérimentation se fera sur une période maximale de 6 mois, à l'issue de laquelle tous les animaux seront euthanasiés.

14476 Le but de cette unité d'enseignement (UE) de 2^{ème} année du master Sciences du Vivant Parcours NeuroPhysiologie Appliquée est l'acquisition d'une formation pratique solide en neurosciences et physiologie permettant la mise en œuvre des pratiques en matière d'expérimentation animale que les étudiants ont acquis au cours de l'UE de certification en matière d'expérimentation animale niveau Praticien sur Rongeurs qu'ils ont eu à suivre et valider lors de leur 1^{ère} année de master. Au cours de cette UE, les étudiants auront ainsi à pratiquer sur l'animal dans le respect et la mise en œuvre du cadre réglementaire en matière d'expérimentation animale et à gérer et mettre en œuvre de manière autonome et/ou encadrée par des enseignants chercheurs confirmés en matière d'expérimentation animale deux protocoles expérimentaux comme il est fait dans les laboratoires agréés par les personnels habilités. Le projet mis en œuvre dans cette saisine correspond à des approches expérimentales couramment utilisées dans les laboratoires de recherche en Neurosciences visant à étudier les effets comportementaux de l'absence de production d'androgènes suite à une castration et une supplémentation hormonale partielle ou complète en testostérone. Il s'agira de réaliser une castration chirurgicale chez des rats prépubères (cette opération sera réalisée par des enseignants-chercheurs habilités en chirurgie) et à les supplémenter partiellement ou complètement en testostérone pour étudier les effets de la suppression complète ou partielle de la production d'androgènes sur différents aspects du comportement (activité, anxiété, comportement sexuel, comportement social). Par rapport aux principes de la règle des 3R, le recours à l'animal pour réaliser ce type d'expérimentation ne peut pas être substitué par des systèmes virtuels ou cellulaires, le but au niveau du master étant de former les étudiants à la pratique de l'expérimentation animale dans le champ des neurosciences (Remplacement). Le nombre total d'animaux mis en jeu sera de 96 rats par année, nombre estimé nécessaire et suffisant pour permettre l'étude du comportement qui nécessite des groupes d'animaux de taille adéquate afin de réaliser une analyse statistique convenable des résultats. Le nombre total d'animaux qui sera utilisé pour ce projet d'une durée de 5 ans sera donc de 480 rats. Chaque année, 64 rats (32 mâles et 32 femelles) seront utilisés uniquement pour permettre la réalisation des tests comportementaux d'étude du comportement sexuel et du comportement social qui seront réutilisés dans le cadre d'autres TP (Réduction/raffinement). Pendant les TP, les étudiants certifiés auront à gérer le déroulement et la réalisation du projet et des différentes procédures qui le concernent dans le respect des règles fixées par les contraintes réglementaires et à assurer le bien-être des animaux dont ils seront garants (Raffinement). Les étudiants inscrits dans le master qui ne sont pas certifiés assisteront les étudiants certifiés dans le déroulement et la gestion des procédures sans pour autant intervenir sur les animaux (Raffinement). Enfin, ces TP seront encadrés par les enseignants-chercheurs de l'équipe pédagogique tous certifiés de niveau Concepteur sur Rongeurs et formés aux techniques utilisées, la procédure chirurgicale visant à castrer les animaux étant réalisée uniquement par des enseignants chercheurs habilités en matière de chirurgie (Raffinement). Les animaux seront surveillés quotidiennement et les points limites mentionnés dans la saisine relatifs à un état de mal-être persistant relevés (perte de poids corporel supérieure à 10% du poids de départ, perte de poids >20% sur 3 jours, état de stress apparent de l'animal se maintenant suite à la manipulation par les étudiants (maintien d'un comportement agressif, cris récurrents), tout signe de lésion suite à l'administration de la substance (saignement, difficulté respiratoire et/ou cardiaque), signes comportementaux anormaux (prostration, hyperactivité, signes d'agressivité vis-à-vis des congénères), signes apparents de mauvaise cicatrisation de la plaie). Les rats utilisés pour ces TP à l'exception de ceux utilisés pour les tests d'interaction sociale et de comportement

sexuel seront mis à mort selon une méthode réglementaire alors que ceux utilisés pour l'étude du comportement sexuel et du comportement social seront conservés et pourront être utilisés dans le cadre d'autres actions de formation sur avis du personnel de l'EU et de la structure en charge du bien-être animal de l'établissement, au besoin complété par l'avis du vétérinaire référent. Ils ne seront mis à mort selon une méthode réglementaire qu'en dernier recours.

14477 Les biofilms bactériens sont généralement définis comme des agrégats de cellules bactériennes attachés à une surface et enrobés d'une matrice visqueuse. La formation d'un biofilm se fait selon un modèle bien établi et suit différentes étapes (adhésion, croissance, maturation et dispersion). On estime que 80 % de la biomasse microbienne de notre planète réside sous forme d'un biofilm. Le biofilm protège les bactéries et leur permet de survivre dans des conditions environnementales hostiles. Les bactéries du biofilm peuvent résister à la réponse immunitaire de l'hôte et sont beaucoup plus résistantes aux antibiotiques et aux désinfectants que les cellules bactériennes planctoniques (non adhérentes). Ainsi, la présence de biofilm dans les infections est particulièrement redoutée en clinique (ex sondes de ventilation mécanique, prothèses, cathéters veineux...). Parmi les espèces bactériennes largement retrouvées dans les biofilms figurent les espèces du genre *Staphylococcus* sp.

La plupart des antibiotiques n'ont qu'une activité très modérée sur un biofilm en cours de constitution (biofilm précoce) et une activité quasi nulle sur un biofilm déjà constitué (biofilm mature), ce qui conduit le plus souvent, soit à l'utilisation d'antibiotiques au long cours et à fortes doses, soit à la dépose du matériel infecté. De nouvelles pistes de développement sont actuellement explorées et certains composés tels que le composé DEB semblent présenter une activité « anti-biofilm » *in vitro* intéressante. Dans ce projet, nous nous proposons d'évaluer l'activité du composé DEB (en association avec d'autres antibiotiques de référence) dans un modèle *in vivo* d'infection sur cathéter à *Staphylococcus aureus* chez la souris. Un projet très similaire a déjà fait l'objet d'une soumission et acceptation par le comité d'éthique (Mai 2016). L'expérience doit être répétée à la demande de l'industriel qui souhaite tester la combinaison avec de nouveaux antibiotiques, et ce dans deux modèles distincts. En effet, deux modèles de biofilm précoce seront testés un modèle à *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline déjà au point (utilisant 48 souris) et un autre sensible à la méthicilline nécessitant une phase pilote (36 souris seront utilisées pour la phase pilote et 80 pour la phase d'efficacité). Au total, 164 souris femelles de 8-10 semaines seront utilisées.

La mise en place de ce projet s'est attachée à respecter la règle des 3R

Remplacer Une partie des résultats préliminaires a été réalisée *in vitro* (comparaison des caractéristiques de résistances aux antibiotiques des 2 souches de staphylocoque testées) mais la complexité d'un être vivant ne peut pas être mimée en laboratoire, nécessitant donc l'utilisation de modèles animaux.

Réduire Le modèle de biofilm formé à partir de la souche MRSA a déjà été mis au point dans de précédentes études et ne nécessitera pas d'animaux supplémentaires. La seconde partie de l'étude concernant la souche MSSA sera précédée d'une phase pilote qui sera réalisée sur un nombre réduit d'animaux (6 souris par groupes). Les autres phases d'études nécessiteront 8 souris par groupe afin d'atteindre la puissance statistique nécessaire à l'interprétation des données avec le test Kruskal-Wallis suivi du test post-hoc de Dunn.

Raffiner La procédure chirurgicale, réalisée sous anesthésie générale a été optimisée, réduisant ainsi le temps de manipulation des animaux au profit de leur récupération. Les animaux seront hébergés dans un environnement adapté et enrichi.

14478 Les cardiopathies univentriculaires sont un ensemble représentant 10% des cardiopathies congénitales malformatives. Elles sont graves et entraînent une mortalité de 85% dans les deux premières années de vie en l'absence de traitement. Leur point commun est l'absence de deux ventricules fonctionnels (droit et gauche) permettant d'assurer le débit cardiaque. La « circulation de Fontan » est un montage chirurgical réalisé chez l'homme pour pallier ces cardiopathies

Décrit en 1970, il a permis une amélioration considérable du pronostic à moyen terme. Il consiste à court-circuiter le cœur droit (oreillette et ventricule droits) et ainsi connecter les deux veines caves (supérieure et inférieure) à la circulation pulmonaire (artère pulmonaire droite).

Bien qu'efficace, à long terme, cette circulation défaille inévitablement et entraîne une défaillance polyviscérale. A ce jour, la seule issue thérapeutique est la transplantation cardiaque.

Malgré de nombreux travaux, plusieurs aspects de la physiopathologie du Fontan, notamment défaillant, restent à ce jour peu étudiés. Cela s'explique, en partie, par le manque de modèle expérimental animal chronique de circulation de Fontan.

Le projet a pour objectif principal de créer un modèle chronique de circulation de Fontan.

Une fois ce modèle validé, nous utiliserons ce modèle pour étudier les conséquences sur les différents organes (poumons, foie, reins), identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Enfin, il nous permettra l'étude de systèmes d'assistance circulatoire adaptés *in vivo*.

Nous développerons un modèle ovin de circulation de Fontan. Cette espèce, de par la proximité de son anatomie avec celle de l'Homme, facilitera la translation des résultats à la clinique. Cet aspect translationnel ne serait pas retrouvé chez le rongeur chez qui l'anatomie et la physiologie cardiaque diffèrent et qui complexifierait grandement la mise en œuvre de notre projet au niveau chirurgical et de l'exploration *in vivo* des animaux.

La réalisation technique de ce montage, son caractère chronique et l'investigation de tissus animaux nous imposent la création d'un modèle chez le gros animal, empêchant LE REMPLACEMENT des animaux. Bien que les données obtenues à partir de ces études ne peuvent être obtenues à partir d'études informatiques, elles pourront à terme être incorporées à des modèles numériques et participer ainsi au remplacement et à la réduction du nombre d'animaux utilisés dans de prochaines études, ainsi qu'à leur raffinement.

Nous avons fixé à 20 le nombre d'animaux nécessaires à la réalisation du projet. Le nombre d'animaux a été REDUIT au minimum, la faisabilité du projet étant conservée. En effet, on se limitera aux seules expériences considérées comme absolument indispensables pour fournir des résultats concluants.

D'autre part, nous sommes en mesure de pratiquer la plupart des différentes investigations à la suite les unes des autres ce qui nous permettra d'accroître la quantité d'informations obtenues à partir d'un animal et ainsi de limiter l'utilisation globale d'animaux. Le projet est réalisé avec un suivi chronique, le bien-être des animaux sera particulièrement pris en compte lors de leur prise en charge, toutes les mesures de RAFFINEMENT seront mises en place anesthésie, suivi des constantes, analgésie, compétences des personnels, conditions d'hébergement et mesures d'enrichissement adaptées à l'espèce (groupes sociaux, paillage, pierre à sel par exemple).

14479 La douleur est un processus physiologique nécessaire pour prévenir l'organisme d'un danger imminent permettant ainsi la mise en œuvre de réponses adaptées visant à en limiter les effets délétères. Cependant, lorsque la douleur est chronique ou persistante, elle devient alors pathologique car elle n'offre plus aucun avantage et provoque une extrême souffrance. C'est notamment le cas des douleurs neuropathiques ou inflammatoires apparaissant suite à des lésions ou inflammation du système nerveux périphérique ou central, caractérisées par la manifestation de symptômes douloureux, notamment l'allodynie, qui correspond à une douleur provoquée par une stimulation normalement non douloureuse. Les traitements disponibles ne sont souvent que partiellement efficaces et peuvent s'accompagner d'effets secondaires importants. Il est donc nécessaire de disséquer les mécanismes sous-tendant ces douleurs chroniques afin de découvrir de nouveaux traitements.

Dans un contexte physiologique, les informations tactiles et douloureuses provenant de la face sont acheminées à des niveaux différents du tronc cérébral, plus particulièrement au niveau du sous-nyau caudal (Sp5C). En contexte pathologique, l'information tactile est capable d'activer les neurones nociceptifs induisant l'allodynie. Cette activation est permise grâce à un circuit impliquant différents types cellulaires. En effet, les astrocytes favorisent la libération de neurotransmetteurs mais également l'accumulation extracellulaire en potassium, favorisant ainsi l'hyperexcitabilité

neuronal et l'apparition des symptômes douloureux. D'autres études montrent quant à elles l'importance des neurones et plus particulièrement les interneurons exprimant la Calretinine (Cr), présents à la jonction entre les circuits non nociceptifs et circuits nociceptifs, suggérant que les neurones Cr seraient impliqués dans le processus douloureux et l'induction de l'allodynie. Cependant le lien entre activation neuronale et astrocytaire dans le développement de l'allodynie reste inconnue.

L'objectif de ce projet est donc de montrer le rôle des neurones Calretinine dans la modulation de l'activité astrocytaire et la genèse de l'allodynie.

Cette étude nécessitera l'utilisation de 284 souris sur 12 mois. Afin de comprendre au mieux les processus pathologiques de la douleur, il est nécessaire d'utiliser des animaux qui sont les seuls modèles de physiologie intégrée. Aucune méthode alternative actuelle ne permet de modéliser les réseaux cellulaires complexes de la corne dorsale qui font l'objet de ce projet. Cependant, pour respecter la règle des 3R, le nombre d'animaux a été réduit au maximum tout en permettant de discriminer un effet significatif entre les conditions expérimentales et calculé par tests statistiques adaptés. En respect de la règle des 3R, les animaux seront hébergés en milieu enrichi (social et environnemental) afin de respecter au mieux leur confort et leur niveau de stress. Les animaux seront 4-5 par cage dans une animalerie thermorégulée ($22\pm 1^\circ\text{C}$), avec cycle de lumière inversé (lumière de 19h à 7h). L'accès à la nourriture et à l'eau sera ad libitum. Les cages seront contrôlées quotidiennement (nourriture, eau, état de santé général des animaux) et un changement de litière sera effectué 1 fois toutes les 2 semaines. Aucun des modèles de douleurs décrits dans ce projet n'induit de déficit locomoteur sévère pouvant influencer sur les besoins physiologiques de l'animal. De plus, l'expérimentation sera arrêtée si l'animal montre une perte de poids supérieure à 15% de la perte de poids généralement observée au laboratoire suite à un traitement. Enfin, les tests comportementaux à la douleur seront réduits au minimum (fréquence et intensité des tests) et réalisés selon des protocoles expérimentaux établis et maîtrisés par le laboratoire, et acceptés par la communauté scientifique.

Pour ce projet, nous proposons d'utiliser des modèles de souris transgéniques permettant de manipuler les neurones Cr. Pour activer spécifiquement les neurones Cr du sous-noyau caudal, nous allons réaliser des injections de virus dans le Sp5C permettant l'expression dans les neurones Cr d'un récepteur neuronal activable soit par une molécule, soit par lumière, afin d'étudier

1. Les effets de l'activation des neurones Cr sur l'expression de la protéine astrocytaire GFAP. Pour cette étude, deux groupes seront utilisés, un pour déterminer si l'activation des neurones Cr induit une douleur chez l'animal (36 animaux) et une activation astrocytaire par immunohistochimie ou analyses protéiques ($n=24$ animaux). L'activation des neurones Cr étant transitoire, et afin de respecter la règle des 3R (réduire), les mêmes animaux seront utilisés pour analyser la douleur spontanée, évoquée et l'activation du Sp5C.

2. Les effets de l'activation des neurones Cr sur les propriétés électrophysiologiques des astrocytes. Pour cela, un groupe d'animaux sera utilisé pour les différents enregistrements électrophysiologiques neuronaux et astrocytaires. Dans cette étude, chaque cellule enregistrée est son propre contrôle ce qui permet de réduire le nombre d'animaux (40 animaux).

3. Les effets de l'activation des neurones Cr sur l'activité calcique astrocytaire. Un groupe d'animaux sera utilisé pour l'imagerie calcique. Dans cette étude, chaque tranche du Sp5C enregistrée est son propre contrôle ce qui permet de nouveau de réduire le nombre d'animaux ($n=12$ animaux).

Des études pilotes seront réalisées afin de mettre au point les différents paramètres d'injections virales, ce qui nécessitera 10 animaux par étude (soit au total 30).

De plus, ces différentes études seront réalisées à la fois chez le mâle et chez la femelle, en nombre égal, ce qui double le nombre d'animaux décrit ci-dessus. Cependant, si au cours des expériences, nous constatons qu'il n'y a pas de différences liées au sexe, nous regrouperons les deux sexes dans l'étude, ce qui permettra de diviser par 2 le nombre d'animaux utilisé.

14480 La chirurgie mini-invasive du fœtus par voie endoscopique est en plein essor grâce à la miniaturisation des fibres optiques et le développement de l'instrumentation chirurgicale. Ainsi

certaines pathologies (syndrome transfuseur-transfusé, hernie de coupole diaphragmatique et myéломéningocèle) peuvent bénéficier d'une prise en charge anténatale, ce qui permet de diminuer la morbidité voire la mortalité néonatale.

Concernant la chirurgie prénatale de la myéломéningocèle, la foetoscopie reste cependant une approche difficile car elle implique la réalisation de dissections et de sutures en milieu liquidien (le liquide amniotique). Certaines équipes ont proposé de remplacer, le temps de la chirurgie, une partie du liquide amniotique par du gaz. Un total de vingt-six cas de réparation foetoscopique de myéломéningocèle avec insufflation de CO₂ a été publié à ce jour. Cette nouvelle technique permet d'optimiser et de faciliter la chirurgie car l'intervention se déroule en milieu aérien (comme une coelioscopie classique) plutôt qu'en milieu liquidien.

Cette nouvelle approche constitue donc potentiellement un nouveau paradigme dans le domaine de la chirurgie fœtale, mais la sécurité de l'insufflation d'un gaz dans l'utérus pendant la grossesse doit encore être démontrée. Le CO₂ est le gaz le mieux connu et le plus utilisé en coelioscopie. Cependant, il pourrait entraîner entre autres une hypercapnie voire une acidose chez le fœtus. L'Hélium pourrait être une alternative car sans effet sur l'équilibre acido-basique mais il est moins soluble que le CO₂, ce qui peut poser problème en cas d'absorption vasculaire.

Des expérimentations animales sont nécessaires pour évaluer les effets de la foetoscopie au gaz sur la physiologie cardio-respiratoire et l'état acido-basique materno-fœtal. Certaines évaluations ont déjà été conduites chez la brebis gestante mais elles ne sont malheureusement pas extrapolables à l'humain car la placentation chez la brebis est syndesmo-choriale et non hémochoriale, c'est-à-dire que, contrairement à l'humain, il n'y a pas de contact entre le sang maternel et l'épithélium chorial. D'où l'intérêt du modèle du macaque, chez qui la placentation est de type hémochoriale et très proche de celle de l'humain. L'équipe partenaire a développé la foetoscopie chez le macaque depuis 2009 et a aujourd'hui l'expérience la plus importante de ce modèle au niveau mondial.

L'objectif est d'évaluer les effets de la foetoscopie au gaz (CO₂ et Hélium) sur la physiologie cardio-respiratoire et l'état acido-basique materno-fœtal, dans le modèle du macaque.

L'intervention consistera en une simple foetoscopie dans le troisième tiers de la gestation. Il n'y aura pas de geste chirurgical réalisé sur le fœtus mais seulement la voie d'abord elle-même, c'est-à-dire l'introduction de l'endoscope dans la cavité utérine. Une insufflation de gaz dans la cavité utérine sera réalisée pendant 2 heures et les données pertinentes seront collectées chez la mère et le fœtus, en particulier pour ce qui concerne l'état acido-basique.

La femelle gestante est remise dans son groupe social dès le lendemain. L'utilisation de l'endoscopie, les protocoles d'anesthésie et d'analgésies (aussi bien généraux que locaux) permettront de réduire au minimum le mal être de l'animal en raffinant (Raffinement) au maximum chaque étape du protocole.

Une série exploratoire avec la collection de données sur 16 interventions (8 avec insufflation au CO₂ et 8 avec insufflation à l'Hélium) sera réalisée dans un premier temps, et donnera lieu à une analyse avant d'envisager d'autres éventuelles interventions, dans le but de réduire (Réduction) autant que possible le nombre d'animaux nécessaires. Les animaux utilisés lors de ces interventions seront des macaques cynomolgus (*Macaca fascicularis*, 16 animaux 8 adultes et 8 fœtus) et des macaques rhésus (*Macaca mulatta*, 16 animaux 8 adultes et 8 fœtus). Soit un total de 32 animaux (16 femelles gestantes + 16 fœtus).

Le projet nécessitant l'utilisation d'animaux vivants afin de considérer l'impact de cette méthode sur leur organisme, il n'est pas possible d'utiliser ni des programmes informatiques, ni des cultures cellulaires (Remplacement).

14481 Chaque année en France environ 300 000 nouveaux cas de cancer solide sont diagnostiqués. Dans la majorité des cas, une rechute est observée après la suppression de la tumeur par chirurgie. Dans le cancer du sein notamment cette rechute est d'environ de 50% des cas et due à la présence de cellules tumorales résiduelles. Afin de limiter, voire d'empêcher la récurrence, nous proposons

d'implanter à proximité de la zone où a été enlevé la tumeur une puce microfluidique capable d'attirer et de détruire les cellules tumorales résiduelles.

L'objectif principal est de démontrer que notre puce est capable d'empêcher l'évolution de la tumeur. Nous avons déjà fait la preuve du concept *in vitro*. Aujourd'hui, nous souhaitons démontrer *in vivo* que cette puce pourra également attirer les cellules tumorales et les détruire.

Pour cela, nous proposons dans un premier temps de greffer la puce en sous cutané chez un modèle animal, puis dans une deuxième phase d'injecter les cellules tumorales à proximité de la puce et suivre l'évolution de la tumeur.

Le modèle choisi est la souris immunodéficiente Balb/c "nude" car elle est un modèle de choix en oncologie notamment pour la greffe de cellules tumorales provenant de lignées humaines. Un total de 72 animaux est prévu pour l'ensemble du projet.

Dans le cadre de ce projet, tout sera mis en oeuvre pour respecter au mieux la règle des 3R

(Remplacer) Il s'agit de vérifier *in vivo* les résultats observés *in vitro* afin de tester à l'avenir notre dispositif chez l'homme. Il n'existe pas de méthodes alternatives permettant de faire la preuve du concept *in vivo*.

(Réduire) Le nombre d'animaux a été réduit au strict minimum, en considérant toutefois un nombre suffisant permettant d'observer une différence significative entre les groupes.

(Raffiner) La souffrance et l'angoisse de l'animal seront prévenues par la réalisation d'une anesthésie générale pendant toute la durée du protocole. Une étude des comportements sera réalisée en post opératoire avec adjonction, si besoin, d'antalgiques. Nous attacherons une importance majeure au raffinement des conditions d'hébergement et de soin. Le personnel impliqué est sous la responsabilité du porteur de projet formé à l'expérimentation animale ("Conception et réalisation des procédures expérimentales") et sera assisté par une personne du plateau technique qui a l'expérience du travail sur rongeurs et ayant suivi une formation à la chirurgie expérimentale.

14482 Le cancer de l'ovaire est la pathologie gynécologique associée à la plus forte mortalité dans les pays développés. La plupart des patientes diagnostiquées le sont à des stades avancés de la maladie, lorsque le cancer présente déjà des métastases au-delà de l'ovaire. Tandis qu'on observe souvent une réponse initiale à la chirurgie et la chimiothérapie, le pronostic à long terme est généralement non favorable, associé à l'apparition de récurrences et à la mise en place de mécanismes de résistance aux drogues. Il existe donc un besoin important d'identifier de nouveaux agents thérapeutiques prolongeant la durée de survie et contrecarrant les résistances qui s'établissent. Dans l'optique du développement de telles molécules, les modèles expérimentaux chez la souris permettent d'étudier la biologie de la tumeur en réponse à de nouveaux traitements. L'objectif de ce projet est d'évaluer le potentiel anti-tumoral d'un candidat médicaments qui a déjà fait état de fortes propriétés anti-tumorales en laboratoire en "assoiffant" les tumeurs (c'est à dire en les privant de vascularisation) et en éduquant le système immunitaire à combattre les cellules cancéreuses. Le candidat médicament en question cible une molécule surexprimée au niveau de la tumeur, limitant ainsi les effets secondaires du traitement.

L'éventuel effet anti-tumoral du produit sera testé dans un modèle de greffe tumorale, en considérant l'inoculation de cellules cancéreuses ovariennes de souris dans des animaux immunocompétents. Trois sites d'implantation des cellules tumorales seront considérés chronologiquement une greffe sous-cutanée (mimant le développement d'une tumeur primaire), un modèle de dissémination métastatique intra-péritonéale, et un modèle impliquant l'implantation des cellules directement dans la bourse de l'ovaire (chirurgie). Ce dernier modèle, plus représentatif de la réalité pathophysiologique (modèle translationnel) permettra de mettre en évidence un effet "mémoire" de la réponse immunitaire anti-tumorale médiée par le traitement expérimental (seules 3 administrations seront réalisées).

Un nombre maximal de 20 souris par condition expérimentale sera considéré (compte-tenu des différences d'expression tumorale des cibles moléculaires au sein d'une même colonie de souris), y compris pour les contrôles en présence d'un produit supposé inactif ou du solvant seul, en ne considérant par souci de reproductibilité que des souris femelles âgées de 8 semaines (à

l'implantation des cellules) – une étude préliminaire permettra de déterminer le nombre d'animaux nécessaires pour obtenir un résultat statistiquement significatif. Celle ci pourra comprendre entre 6 et 8 animaux par groupe, et l'absence d'effet anti-tumoral des candidats médicaments durant cette phase pilote impliquera l'arrêt de la procédure. L'analyse de la significativité sera réalisée en considérant un test statistique approprié. Pour chaque procédure et en cas d'effet avéré du produit testé, la spécificité d'action vis à vis de sa cible moléculaire sera vérifiée dans des souris n'exprimant pas la molécule ciblée.

Le nombre maximal d'animaux considéré est par conséquent de 480 souris, pour un projet d'une durée maximale de 5 ans.

La réalisation d'une étude préliminaire, l'aspect séquentiel des procédures ainsi qu'une étude approfondie de la littérature sont autant d'efforts mis en oeuvre pour réduire le nombre d'animaux utilisés dans la présente étude. Dans un souci de raffinement, nous veillerons à améliorer autant que possible le bien-être des animaux utilisés (suivi quotidien, éléments placés dans la cage pour favoriser la motricité, etc...) et à diminuer au mieux les contraintes qu'ils subissent. De même, l'acte chirurgical nécessaire à la mise en place du modèle de chirurgie (bourse de l'ovaire) fera l'objet d'une procédure d'anesthésie adaptée et de soins post-opératoires tel que décrit dans le présent projet.

Les propriétés inhibitrices de la vascularisation tumorale du produit testé ont déjà été largement démontrées dans les modèles *in vitro* et *ex vivo* et la littérature concernant les cibles moléculaires soutient la pertinence d'un tel outil thérapeutique. Ces expérimentations, dont le bénéfice attendu est une diminution significative du volume tumoral et/ou de la longueur et du volume moyens des vaisseaux sanguins alimentant la tumeur, constituent un prérequis indispensable afin de consolider la preuve de l'efficacité du candidat médicament avant d'envisager son utilisation dans le cadre d'essais cliniques.

Les effets attendus du produit sont supposés se restreindre à l'environnement tumoral, au sein duquel la molécule ciblée est fortement surexprimée. Cependant, un suivi quotidien des animaux sera assuré afin de limiter toute souffrance. Ainsi, toute modification du comportement (isolement, anxiété, ataxie) sera une indication pour l'euthanasie des animaux. Il en est de même pour tout gain ou perte important(e) de masse corporelle (15% de la masse des animaux), ou encore en cas de distension abdominale importante sous l'effet de la production d'ascites (fluides abdominaux générés dans le modèle de dissémination péritonéale).

14483 Contexte scientifique Au sein de notre unité, nous travaillons principalement sur les tumeurs cutanées.

Notre projet a trait à l'étude d'un traitement anti cancéreux putatif, utilisé au départ dans les pathologies cardiaques. Ce médicament s'est révélé très efficace dans le traitement de l'hémangiome infantile, une tumeur vasculaire cutanée bénigne qui atteint jusqu'à un enfant sur dix. Ce traitement est ainsi devenu depuis 2008, le traitement de référence.

Notre étude porte sur le rôle anti-tumoral de ce médicament et propose l'utilisation de celui-ci pour le traitement d'autres tumeurs. Nous avons choisi comme modèle d'étude un cancer particulier du cerveau (glioblastome). Dans ces tumeurs, nous étudions les modifications d'expression de différents facteurs pro-tumoraux en fonction du traitement ainsi que le volume tumoral et l'architecture des vaisseaux sanguins.

Descriptions des objectifs du projet Lors de précédents travaux *in vitro* et *in vivo*, nous avons mis en évidence un nouveau mécanisme d'action du médicament qu'il est important de confirmer en vue de la publication de ce travail et ainsi la divulgation internationale de cette découverte qui pourra participer à améliorer le traitement des malades dans le monde.

Une tumeur sera injectée dans le flanc droit de chaque souris afin de tester le bénéfice d'un nouveau traitement. Les souris recevront ce traitement (ou un placebo) dans l'eau de boisson pendant toute la durée de l'expérimentation. Ce médicament déjà utilisé chez l'homme pour des problèmes cardiaques est très bien toléré. Les souris recevront un deuxième traitement aussi utilisé chez l'homme, cette fois par injection, deux fois par semaine, lui aussi est très bien toléré. Deux fois par

semaine les tumeurs seront mesurées à l'aide d'un pied à coulisse. La bonne santé des animaux sera évaluée tout le long de l'expérimentation selon la législation actuelle. Une fois l'effet anti-tumoral observé chez les souris, l'ensemble des souris seront euthanasiées et les tumeurs seront récupérées pour analyse.

Dans ce projet nous utilisons le minimum d'animaux nécessaire à notre démonstration. Toutes les démonstrations ne nécessitant pas impérativement une expérimentation animale sont réalisés *in vitro* ou *in silico*. En revanche, à ce jour, il n'existe pas de méthodes alternatives suffisamment prédictives pour mimer les tumeurs vasculaires semblables à celle de l'homme. Les modèles cellulaires ou 3D actuels nous permettent seulement de travailler sur des dysfonctionnements isolés de la maladie et non sur la maladie dans son ensemble au sein d'un individu tout entier. Nous ne pouvons donc pas remplacer le modèle utilisé par une méthode alternative. De plus, de part ces 99% d'homologies avec le génome humain, la souris représente le meilleur modèle pour travailler sur les maladies humaines. Le nombre de souris nécessaire à la réalisation de ce projet a été scrupuleusement réduit au minimum en tenant compte de nos 10 ans d'expériences en la matière.

Dans le respect de la règle des 3R

-Afin de restreindre le nombre d'animaux, nous combinerons nos lots témoins. De plus, le nombre d'animaux a été défini d'un point de vue statistique afin de réduire leur nombre. Nous avons déterminé via des tests statistiques qu'un lot de 10 souris par groupe était nécessaire pour avoir des données statistiquement exploitables à la fin de l'étude.

-En matière de raffinement le bien-être de nos animaux sera pris en compte dès leur naissance jusqu'à leur mort hébergement en cages collectives, enrichissement de l'environnement et points limites précoces adaptés afin d'éliminer ou de réduire toute douleur, souffrance, angoisse et dommage susceptible d'être infligé à ceux-ci. De plus, une surveillance des animaux et une évaluation de leur bien-être sera réalisée quotidiennement par les intervenants et le personnels qualifiés de l'animalerie afin de s'assurer que tout au long du projet les animaux sont en bonne santé, sans comportement anormal ou signes de souffrance. Si toutefois, une souris montre le moindre signe de souffrance ou d'inconfort, un antidouleur lui sera administré. Pour la réalisation de ce projet, nous avons également établie des mesures conservatoires et des points limites adaptés à chaque protocole et/ou situation nous permettant de prendre les décisions qui s'imposent face à la souffrance ou l'inconfort de nos animaux.

-Remplacement Nous avons partiellement remplacé les études *in vivo* par des études préalables *in vitro*. En revanche, à ce jour, il n'existe pas de méthodes alternatives suffisamment prédictives pour mimer les tumeurs du cerveau que nous étudions et semblables à celle de l'homme. Nous ne pouvons pas remplacer l'utilisation des animaux par des tests *in vitro* ou *in silico* car le mécanisme que nous étudions est trop complexe pour être modélisé sans expérimentation chez la souris.

^[1]_{SEP} Pour réaliser l'ensemble de nos expériences sur les nouveaux traitements contre le gliome nous demandons l'utilisation de 240 souris.

14484 La mission de notre centre de recherche est de mettre au point des aliments destinés à l'alimentation des porcs. Au cours de nos essais, nos principales mesures sont d'ordre zootechnique consommation d'aliments, évolution de la croissance, suivi sanitaire. Afin d'approfondir nos essais, nous sommes parfois amenés à réaliser des prélèvements sanguins pour compléter nos mesures classiques et pour évaluer l'impact de la nutrition sur plusieurs métabolismes (reproduction, immunité, stress, énergétique, protéique, oligo-vitaminique). Les interactions complexes entre métabolismes ne permettent pas d'utiliser des méthodes alternatives. Le prélèvement nécessaire est du sang veineux périphérique accessible par ponction cutanée avec ou sans contention des animaux. Ces prises de sang sont réalisées comme dans un élevage terrain classique qui effectuerait une prophylaxie. La procédure est de classe légère puisque le volume prélevé est limité au maximum. Ainsi, le volume prélevé est relativement faible : entre 0.5 et 1.5% du volume sanguin/prélèvement. Dans ce projet de 5 ans, les prises de sang sont réalisées sur un échantillon limité d'animaux déterminé par une analyse statistique préalable. Ainsi 1980 porcelets /an auront des prises de sang sur les 5 ans du projet. Les animaux sont élevés en groupe dans des cases sur caillebotis plastique ou béton. Des chaines enrichissement chaque case d'élevage. Cet

enrichissement efficace leur permet de machouiller. La contention est réduite au minimum nécessaire pour effectuer le prélèvement sanguin dans les conditions de sécurité pour l'animal et les opérateurs. Lorsque la contention est nécessaire, toutes les mesures sont prises pour limiter la peur et la douleur des animaux faisant l'objet des prélèvements et de leurs congénères.

La sélection des animaux prélevés est réalisée quelques jours avant. Seulement les animaux bien portants et représentatifs de chaque lot sont sélectionnés. En fonction de signes cliniques notables ou sévères, le prélèvement de sang est arrêté et l'animal peut être sorti de l'essai. Les animaux prélevés sont surveillés étroitement pendant les 2 jours qui suivent la prise de sang. En présence d'un signe clinique notable, le protocole de soin de l'élevage est appliqué. En présence d'un signe clinique sévère, l'animal est mis en hors essai et le protocole de soin de l'élevage est appliqué.

14485 La thérapie photodynamique (PDT) est un traitement employé en cancérologie pour éradiquer les tumeurs de petites tailles accessibles à la lumière. Le principe repose sur l'activation, en présence d'oxygène et de lumière, d'une molécule appelée photosensibilisateur (PS) qui se localise préférentiellement dans la tumeur. La méta tétra-(hydroxyphenyl)chlorine (mTHPC) connue sous le nom Foscan® est un PS approuvé en clinique pour le traitement alternatif à la chirurgie des tumeurs des voies aéro-digestives supérieures. La mTHPC est un PS peu soluble dans l'eau et par conséquent il persiste longtemps au niveau du site d'injection, ce qui freine sa distribution aux organes et notamment à la tumeur. Pour améliorer cette stabilité et ainsi mieux délivrer la molécule à la tumeur, nous proposons de la diluer dans une solution à base de lipides et ainsi permettre sa dissolution. Les PS étant pour la plupart fluorescents, il est possible de suivre leur devenir dans l'organisme par des techniques basées sur la détection de la fluorescence émise par ces molécules. Le projet a pour objectif d'évaluer par microscopie de fluorescence la distribution de PS dans la tumeur prélevée en fonction du temps après injection par voie intraveineuse de la mTHPC en utilisant le solvant à base de lipides. Nous allons utiliser 5 temps après l'injection de 1h jusqu'à 24h. Le projet consiste à injecter des cellules cancéreuses en sous cutanée chez la souris (Procédure 1) et dès que la tumeur atteint un diamètre de 6-9 mm les souris recevront les différentes formes de PS par voie intraveineuse (i.v.) (Procédure 2). Pour étudier plus précisément la distribution du PS, une injection d'un produit de contraste fluorescent (Procédure 3) juste avant la mise à mort de l'animal, permettra de visualiser les vaisseaux de la tumeur et ainsi préciser la distribution de la molécule d'intérêt. La distribution du PS dans la tumeur sera ensuite visualisée par l'analyse de la tumeur prélevée chez l'animal à des temps de cinétique précis.

Les dommages causés à l'animal sont faibles et reposent surtout sur la nécessité de former des tumeurs humaines et d'injecter les composés en i.v. chez l'animal.

Les souris utilisées seront des souris femelles immunodéprimées « nude » permettant la croissance d'une tumeur d'origine humaine, sans rejet.

Les groupes seront constitués de 5 animaux maximum. Une seule dose de PS sera utilisée, concentration non toxique déterminée lors de précédentes études. L'étude portera donc sur 75 souris maximum avec 1 groupe expérimental (composé à base de lipides) et 2 groupes avec les molécules de référence, avec 5 temps après injection par groupe.

Les animaux seront hébergés à 5 par cage et avec un enrichissement de la cage à base de buchettes, igloos, frisure de papier kraft (raffinement). Les souris devront être maintenues à l'obscurité après l'injection du PS (molécule activée à la lumière) pendant un laps de temps de 24h maximum (temps de cinétique le plus long). Toutes les procédures seront réalisées sur animal anesthésié (Raffinement).

Les animaux seront observés quotidiennement tout au long de l'expérimentation et en cas d'atteinte d'un des points limites fixés (perte de poids de plus de 15% sur 3 jours consécutifs, altération de l'état général de l'animal, modification du comportement, inflammation au niveau du site d'injection, déshydratation évaluée par pincement de la peau), ils seront mis à mort dans des conditions éthiques.

Remplacement Conformément aux exigences de remplacement, l'équipe a testé la toxicité de ces molécules sur cellules. Cependant, l'étude de distribution de molécules dans la tumeur ne peut à

l'heure actuelle être appréhendée sur modèles cellulaires et l'utilisation de modèles animaux adéquats restent indispensables.

Réduction des études antérieures sur souris porteuses de tumeur ont permis d'ajuster les cinétiques de prélèvement des tumeurs ainsi que la concentration en PS. Pour l'analyse statistique, on adoptera une démarche séquentielle. Les groupes seront composés au départ d'un minimum de 3 animaux. On ajoutera 1 à 2 animaux par groupe si nécessaire, notamment pour l'étude du composé d'intérêt.

A la fin de l'expérimentation, l'ensemble des animaux sera mis à mort par dislocation cervicale sous anesthésie gazeuse et le prélèvement de la tumeur sera effectué pour la réalisation des images de fluorescence.

14486 La sérotonine (5-HT) est une monoamine produite dans le cerveau où elle agit comme neurotransmetteur (régissant les communications entre les cellules) et régule de nombreuses fonctions dont l'humeur. Elle est aussi produite à la périphérie par l'intestin et la synthèse de 5-HT dans cet organe est retrouvée dans le sang. Au cours de la gestation, les variations des taux de sérotonine sanguine affectent le développement embryonnaire et le comportement de la descendance. Ce programme de recherche étudie les conséquences de la réduction (de 50%) de 5-HT maternelle sanguine sur le développement de l'embryon et de la descendance sur un modèle de souris déjà bien décrit. Les animaux contrôles issus de femelles dont les niveaux sanguins de 5-HT sont diminués de 50% présentent des modifications comportementales à l'âge adulte (augmentation de l'activité, insomnie chronique) mais pas de modification cérébrale ou anatomique évidente (le poids et taille des cerveaux sont normaux). Notre projet vise à comparer deux groupes d'animaux des animaux contrôles issus de femelles contrôles et des animaux contrôles issus de mères ne produisant que 50% de 5-HT sanguine. Nous déterminerons si ces individus présentent des troubles comportementaux au cours de la première semaine de la vie postnatale et préciserons les altérations comportementales des adultes. Nous recueillerons des données anatomiques sur les animaux euthanasiés.

Ces études nous permettront de préciser les phénotypes comportementaux induits par un manque de sérotonine maternelle et de déterminer les régions cérébrales affectées. Nos données, non publiées, suggèrent, en effet, que la déficience en 5-HT maternelle altère finement mais durablement l'organisation cérébrale, notamment celle des structures impliquées dans la régulation des comportements.

Cette partie du projet s'inscrit dans un projet plus global qui vise à déterminer si le manque de sérotonine maternelle prédisposerait la descendance à développer des troubles comportementaux associés au spectre autistique et à déterminer les régions cérébrales pouvant être impactées.

Les expériences seront réalisées sur 180 souris pendant une période de 5 ans.

Cette étude prendra en compte la réglementation des 3R

Remplacement Les analyses comportementales ne peuvent se faire qu'*in vivo*. Nous avons recours à un modèle de souris déjà bien décrit et ce projet visent à compléter des données bien établies.

Réduction Le nombre d'animaux estimé et les tests statistiques utilisés sont basés sur notre expérience pour ce type d'étude. Ce nombre minimum nous permettra d'être certains de répondre aux questions scientifiques de ce projet. L'analyse statistique de nos données nécessite $n=2 \times 15=30$ animaux par groupe pour mettre en évidence une différence significative. Nous prévoyons cependant de ne pas dupliquer cette étude, s'il s'avère que 15 animaux par groupe suffisent.

Raffinement Ce modèle expérimental est réalisé sur des souris ne présentant pas d'altération évidente. La mise en place de points limites prédictifs pour chaque âge ainsi que l'observation quotidienne du comportement des animaux permettront d'identifier et de limiter toute souffrance et douleur. Si l'un de ces points limites est atteint, les animaux concernés seront euthanasiés selon les méthodes réglementaires. Les animaux seront hébergés en groupe en milieu enrichi pour minimiser leur stress. A la fin de l'étude les animaux seront euthanasiés selon les méthodes réglementaires.

14487 L'importance des communications entre le squelette et d'autres organes comme le cerveau, le rein ou les tissus adipeux en physiopathologie ne fait aujourd'hui aucun doute. Pour autant, les mécanismes d'interaction qui régissent ces interactions sont loin d'être complètement élucidés. Notre but est de mieux comprendre ces mécanismes en portant une attention particulière sur le rôle de la protéine Slc20a2/PiT2. PiT2 est un transporteur de phosphate (Pi) présent à la surface de la plupart des cellules de mammifères. Nos travaux montrent qu'elle joue un rôle important pour la qualité et la solidité osseuse sans pour autant agir directement sur les cellules minéralisantes du squelette. Nos résultats suggèrent que des défauts de communication entre le squelette et d'autres organes pourraient influencer sur l'intégrité du tissu squelettique.

Nous savons qu'il existe un lien étroit entre l'intégrité du tissu squelettique et celle du tissu adipeux présent dans la moelle osseuse (TAM, pour Tissu Adipeux Médullaire). On sait par exemple que l'ostéoporose est associée à une diminution du volume osseux et une augmentation du volume de TAM. Or, nous avons récemment identifié des anomalies de formation du TAM chez les jeunes souris invalidées totalement pour le gène Slc20a2 (Souris PiT2KO). Pour déterminer si PiT2 joue un rôle dans l'équilibre entre ces deux tissus, nous analyserons les effets de l'absence de PiT2 sur le TAM dans un modèle d'ostéoporose post-ménopausale. Ces analyses phénotypiques prennent en compte la règle des 3R et seront donc réalisées sur un nombre d'animaux par groupe correspondant au nombre minimal requis afin d'atteindre une significativité statistique (soit 10 animaux femelles adultes âgées de 12 semaines par groupe et 5 animaux pour adapter l'anesthésie et le geste chirurgical au modèle d'intérêt pour chaque procédure). Les animaux sont hébergés par 5, dans des cages enrichies, sur des portoirs ventilés. Ils seront anesthésiés (sous isoflurane pour la procédure 1 et par injection intra-péritonéale d'un mélange de Ketamine/Xylazine pour la procédure 2) et préalablement placés sur un tapis chauffant pour éviter les risques d'hypothermie. Une réhydratation post opératoire sera réalisée et une analgésie adéquate (injection de buprénorphine et metacam par voie sous-cutanée) sera réalisée pendant tout le temps du projet. Les animaux seront observés quotidiennement. Cinq semaines après l'ovariectomie, les animaux seront mis à mort par dislocation cervicale sous anesthésie. L'étude du phénotype des souris PiT2KO nécessitera 25 souris sur 2 ans. Cette étude vise à comprendre l'implication de la protéine PiT2 dans la physiopathologie du squelette et sa communication avec le tissu adipeux de la moelle. Il n'existe donc pas de méthode alternative à l'utilisation de l'animal pour ce projet.

14488 Le Syndrome néphrotique se caractérise par un défaut de la filtration rénale mis en évidence par l'abondance de protéines dans les urines Parmi les différents types des syndromes néphrotiques, la forme « idiopathique » (sans origine connue) reste la plus grave. Le Syndrome Néphrotique Idiopathique (SNI) évolue rapidement vers l'insuffisance rénale terminale condamnant les patients à un traitement par dialyse responsable d'une mauvaise qualité de vie.

La maladie se développe progressivement au niveau des glomérules rénaux. Dans une phase précoce, des concentrations très élevées de protéines apparaissent dans l'urine. Dans cette phase, la maladie est encore réversible après traitement. En revanche, en cas de résistance au traitement, la maladie progresse vers la destruction des glomérules et donc la perte de la fonction rénale. Le patient est alors traité par dialyse ou par transplantation. Dans le cadre de la transplantation la maladie réapparaît très souvent. Pour expliquer cette résistance au traitement, il a été évoqué la présence dans le sang d'une/des molécule(s) non identifiée(s) toxique(s) pour les reins.

L'une de ces molécules a été identifiée par notre groupe. Il s'agit d'une protéine nommée « CASK ». Elle provoque d'importantes anomalies rénales similaires à celles du SNI. Dans nos études préliminaires, nous avons injecté CASK dans la veine de la queue de la souris. Après 24h, les souris injectées ont montré des symptômes typiques du SNI comme la présence anormalement élevée de protéines dans l'urine.

Parmi les principales particularités du SNI on retrouve son caractère progressif dans le temps de la phase précoce réversible, jusqu'à la destruction du rein. Ce processus se développe dans une période de temps relativement longue (plusieurs mois). Il est ainsi très important d'étudier cette maladie au cours de sa progression afin d'avoir une vision précise de l'évolution des modifications rénales. Il est donc nécessaire de disposer d'un modèle animal approprié.

Pour étudier et traiter cette maladie, nous avons créé une souris transgénique qui secrète CASK dans le sérum. Nous évitons ainsi des administrations injectables, plus pénibles pour les animaux car elles peuvent provoquer des infections et/ou la destruction des vaisseaux.

La validation de notre modèle d'expérimentation sera réalisée par l'analyse des altérations rénales au cours de la maladie. La maladie se développe au niveau des glomérules (glomérulopathie) dans un environnement cellulaire très complexe et son étude implique en particulier l'observation de l'apparition de la fibrose. A l'heure actuelle il n'existe aucun modèle cellulaire qui permettrait d'étudier la maladie dans son intégralité. L'utilisation d'animaux vivants est donc incontournable (leur REMPLACEMENT est impossible).

L'étude que nous proposons cherchera à valider un modèle de syndrome néphrotique dans une souris transgénique par une analyse microscopique afin de vérifier l'apparition (ou non) des lésions de fibrose. C'est le critère qualitatif qui s'impose dans ce projet. En conséquence, si on suit les références statistiques et nos calculs il suffit d'utiliser un total de 20 souris modifiées génétiquement (REDUIRE). Afin de limiter au maximum le stress et la souffrance, les souris ne seront manipulées que par des techniciens agréés. Nous avons aussi programmé des procédures visant à minimiser la taille des groupes afin d'avoir moins de souris par cage, pour augmenter leur confort (RAFFINEMENT).

14489 Le syndrome d'apnées du sommeil (SAS) est le trouble respiratoire nocturne le plus fréquent dans la population. Il est associé à de nombreuses autres pathologies, parmi lesquelles les pathologies cardiovasculaires comme l'hypertension ou l'infarctus du myocarde. Il touche 5 à 20% de la population et est un facteur de risque indépendant de la survenue d'évènements cardiovasculaires fatals et non fatals. Si le traitement actuel de référence du SAS semble fonctionner lorsqu'il est bien toléré, il apparaît essentiel de comprendre les mécanismes à l'origine de ces pathologies associées dans le but de proposer des compléments ou des alternatives thérapeutiques à ce traitement.

Le SAS est caractérisé par plusieurs composantes dont l'hypoxie intermittente (HI) chronique, connue pour avoir le plus fort impact en termes de conséquences délétères cardiovasculaires. Ainsi, nous nous intéressons aux complications cardiovasculaires du SAS induites par l'HI chronique lors de l'ischémie-reperfusion (IR) myocardique, une technique mimant l'infarctus du myocarde chez l'Homme, dans le but 1) d'étudier de nombreux mécanismes susceptibles d'expliquer la mort cellulaire induite par l'HI chronique, et 2) d'élaborer des thérapeutiques ciblées alternatives ou complémentaires au traitement actuel.

Le présent projet a pour but de déterminer le rôle exact d'une protéine activée durant l'hypoxie sur les mécanismes mitochondriaux, métaboliques et cellulaires impliqués lors d'une stratégie thérapeutique par photobiomodulation (PBM). Cette stratégie consiste en l'application d'une lumière monochromatique produite par des LEDs pour stimuler des processus naturels biologiques.

Il nécessitera 828 souris, témoins et transgéniques dont les caractéristiques correspondent à nos besoins, et mettra en œuvre des modèles expérimentaux *in vivo* et *in vitro*. Nous exposerons les animaux à la normoxie ou à l'HI et les traiterons chaque jour par PBM (deux combinaisons de paramètres). A l'issue de ce protocole d'exposition, les animaux seront, soit soumis à une IR cardiaque pour étudier l'effet protecteur de la PBM, soit mis à mort pour étudier, dans différents organes, les mécanismes induits par la PBM et le rôle de notre protéine d'intérêt sur les fonctions mitochondriales et le métabolisme et les mécanismes cellulaires impliqués dans ces traitements, via des techniques *in vitro*, de biologie cellulaire, moléculaire et de biologie des protéines.

Nous avons choisi de travailler avec des souris exposées à la normoxie ou à l'HI pour plusieurs raisons. L'utilisation d'un modèle murin est encouragée par nos travaux précédents dans lesquels nous avons reproduit les conséquences délétères du SAS et aussi parce que la souris nous permet de tester nos hypothèses à l'aide d'absence d'expression de certains gènes (animaux transgéniques). Tous les échantillons seront conservés de façon optimale dans le but de pérenniser notre matériel de travail. Le choix des techniques est varié et nous sommes dans l'obligation d'utiliser diverses techniques (*in vivo* et *in vitro*) pour tester nos hypothèses très mécanistiques.

Nous avons veillé à respecter au maximum la règle des 3R. Pour notre projet nous ne pouvons pas « remplacer » ce modèle animal par un autre modèle cellulaire puisqu'il n'existe aucune méthode alternative à l'expérimentation animale nous permettant de comprendre l'effet de l'HI chronique sur les organes et l'organisme entier. En revanche, suite aux travaux antérieurs de notre laboratoire nous avons « réduit » au maximum le nombre d'effectif par groupe pour observer des éventuelles différences significatives. Nous utiliserons le logiciel GraphPad Prism pour réaliser des tests statistiques adaptés aux paramètres à évaluer (t-tests, tests de variance unidirectionnelle (ANOVA) suivis de tests post-hoc). Enfin le « raffinement » consiste en un hébergement selon les règles de bien-être des animaux dans une animalerie adaptée et autorisée. Les animaux ne seront jamais manipulés dès leur arrivée dans l'animalerie mais uniquement après une semaine de stabulation. Les animaux seront observés quotidiennement dans leur cage pendant toute la durée de l'hébergement et du protocole d'hypoxie, et pesés au moins une fois par semaine, pour s'assurer de leur bien-être et de leur état de santé. L'eau et la nourriture seront à volonté et des enrichissements seront à leur disposition dans les cages.

D'un point de vue scientifique, ce travail permettra d'une part de mieux comprendre la physiopathologie du SAS dans le cadre de l'infarctus du myocarde, et d'autre part, de proposer de nouvelles cibles thérapeutiques aux patients apnéiques à risque cardiovasculaire élevé. En termes de santé publique, ce projet propose la PBM comme une technologie non-restrictive, non-invasive et innovante, en alternative ou en complément du traitement actuel de référence.

14490 L'accident vasculaire cérébral (AVC) ischémique est une pathologie neurologique survenant après l'occlusion d'une artère irriguant le cerveau. Cette pathologie est la 3ème cause de mortalité et la première cause de handicap acquis chez l'adulte dans le monde. En France, cent trente mille nouveaux cas sont répertoriés par an. L'AVC pose donc un problème majeur tant dans le domaine de la santé publique que sur le plan humain. Actuellement, la prise en charge des patients à la phase aiguë de l'infarctus cérébral est réalisée par l'injection intraveineuse de l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) associée ou non à la thrombectomie. Toutefois, seule une faible proportion des patients (<10%) peut être traitée du fait des effets secondaires de l'injection de tPA et de la relative difficulté d'accès à la thrombectomie. Ainsi, il paraît indispensable de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques innovantes visant à traiter efficacement cette pathologie.

L'objectif de ce projet est de tester cinq stratégies thérapeutiques par 3 voies d'administrations différentes afin d'étudier la diminution des volumes lésionnels ainsi que l'augmentation de la récupération fonctionnelle après un AVC. Pour cela, ces stratégies thérapeutiques seront étudiées à l'aide d'un modèle d'infarctus cérébral qui reproduit au mieux la physiopathologie de l'AVC permettant une meilleure transposabilité des résultats obtenus vers la clinique. Ainsi, l'AVC sera induit sur des souris Swiss (*Mus musculus*) mâles âgées de 10 à 12 semaines, en utilisant le modèle d'AVC thromboembolique dont le principe repose sur l'injection d'un agent coagulant (la thrombine) directement dans la lumière artérielle. Ce modèle est aujourd'hui très bien caractérisé chez la souris et toutes les procédures seront organisées afin de se conformer à la règle des 3R, ainsi toutes les manipulations douloureuses seront réalisées sous anesthésie générale avec couverture analgésique pour éviter toutes douleurs, souffrances et angoisses. De plus, les données de la littérature ainsi qu'une étude de puissance statistique en amont permettent de nous assurer que nous utiliserons le nombre minimal d'animaux pour pouvoir conclure d'un effet ou non de notre stratégie thérapeutique. Le suivi de la récupération fonctionnelle pour chaque traitement sera réalisé sur 3 modes d'administration différents pour 83 animaux par méthodes d'administration (+ 10%). Soit un total de 910 souris pour l'étude complète.

Cette étude, ayant recours à l'expérimentation animale, prend en compte le bien-être animal et les pratiques éthiques, et répond à la règle des 3 R. Ce projet correspond à l'étape de validation *in vivo* qui fait suite aux nombreuses validations réalisées *in vitro*, et ne nous permet pas d'utiliser d'autres moyens que de tester cette stratégie thérapeutique chez l'animal. L'ensemble des connaissances et des acquis dont nous disposons dans la littérature font que la souris est un modèle préférentiel pour mener à bien ce projet. En effet, la souris est une des espèces animales la plus étudiée dans le domaine de l'AVC ce qui permettra une analyse comparative et critique des résultats obtenus.

Les expériences seront réalisées par du personnel qualifié en respectant les règles de bonnes pratiques de laboratoire pour le respect des animaux, tout en veillant à ne pas dépasser les points limites fixés au préalable. Le bien-être des animaux sera suivi bi-quotidiennement par du personnel qualifié 5j/7 et quotidiennement pendant les week-ends et jours fériés et cela pendant toute la durée du projet. Les animaux seront hébergés dans des cages standards répondant aux normes européennes actuelles (Directive 2010/63/UE). Pour éviter de stresser les animaux, les cages seront isolées de tout bruit extérieur et l'accès à l'eau et à la nourriture sera ad libitum. Enfin, une importance particulière sera apportée au bien-être des animaux. Tout sera mis en œuvre pour réduire l'anxiété, la souffrance et la douleur de chaque animal, pouvant être occasionnées pendant le projet. Les principes éthiques et les standards de raffinement seront utilisés jusqu'à la mise à mort de l'animal.

14491 L'exposition prénatale au cannabis constitue un problème important de santé publique 5 à 7% des femmes fument du cannabis pendant la grossesse, ces chiffres sont en augmentation constante, il s'agit de plus en plus souvent de cannabis à haute teneur en delta.9-tetrahydrocannabinol (THC), et les études montrent que les femmes méconnaissent la gravité de cette consommation. L'exposition prénatale au cannabis a de nombreux effets délétères sur l'organisme en général et sur le cerveau en particulier. Le cannabis affecte le développement du cerveau, avec des conséquences cognitives et comportementales dans l'enfance et à l'adolescence qui sont bien établies troubles de l'attention et de la mémoire, impulsivité, anxiété, dépression, comportements antisociaux et appétence accrue pour les drogues. L'exposition prénatale au cannabis affecte le développement des systèmes dopaminergiques et sérotoninergiques, ce qui pourrait constituer un mécanisme expliquant certains de ces troubles, car ces systèmes sont essentiels dans l'organisation des fonctions cognitives et affectives. Une des meilleures façons d'explorer ce mécanisme est d'étudier l'activité des neurones de ces deux systèmes chez des animaux adolescents exposés prénatalement au THC. De telles investigations n'ont jamais été faites jusqu'à présent, et ne peuvent être faites que *in vivo* chez des animaux (l'activité des neurones de ces systèmes n'est pas accessible en imagerie cérébrale chez l'homme). Nous pensons que la mise en évidence d'anomalies de fonctionnement de ces systèmes pourrait constituer une contribution importante à la prise de conscience chez les femmes en âge de procréer de la dangerosité de la consommation de cannabis pendant la grossesse.

Pour étudier les conséquences d'une exposition prénatale au cannabis, nous utiliserons 32 rates gestantes Sprague Dawley auxquelles nous administrerons durant la gestation soit du sérum physiologique, soit du THC, qui est le composant du cannabis le plus impliqué dans les conséquences développementales de l'exposition prénatale au cannabis. Nous étudierons ensuite chez les 160 rats mâles nés de ces mères l'activité des neurones par électrophysiologie, sous anesthésie, 80 rats à l'adolescence (6 semaines) et 80 rats à l'âge adulte (14 semaines). Nous utiliserons donc au total 192 rats.

Nous appliquons la règle des trois R

Remplacement nous comptons reproduire une situation analogue à la situation clinique humaine, qui est celle des enfants dont la mère a consommé du cannabis durant sa grossesse. L'effet d'une exposition prénatale au cannabis ne pouvant être étudié d'après nous qu'en administrant du cannabis (ou l'un de ses extraits) à la rate pendant la gestation et en étudiant à l'adolescence et à l'âge adulte le fonctionnement du cerveau des animaux ainsi prénatalement exposés. Il n'y a pas de possibilité de remplacer l'utilisation de l'animal.

Réduction nous enregistrerons lors de la procédure d'électrophysiologie plusieurs neurones par rats, lorsque c'est possible afin de réduire au plus juste le nombre d'animaux.

Nous réduisons à sa valeur nécessaire le nombre d'animaux utilisés en effectuant un calcul prévisionnel statistique de puissance.

Nous nous sommes assuré par une recherche bibliographique que cette recherche n'a jamais été publiée.

Les doses de traitement au THC ont été établies par une revue de la littérature.

Raffinement Nous avons choisi d'utiliser le modèle animal du rat car c'est un mammifère dont le cerveau possède beaucoup de similitudes avec le cerveau humain.

La gestation de rates n'étant que de 21 jours, la durée du traitement prénatal est donc aussi relativement courte ce qui limite la répétition des manipulations.

A leur arrivée au laboratoire les animaux ont une période d'adaptation de 3 jours avant les premiers traitements.

L'administration du traitement au THC par injection intrapéritonéale a été choisi pour partie car il est moins stressant et douloureux que les autres voies d'administration.

Les rates sont pesées et examinées quotidiennement avant et après chaque injection de THC.

Lors des enregistrements électrophysiologiques les rats sont anesthésiés et nous utilisons en complément des anesthésiques locaux.

14492 L'objectif principal de notre plateforme est de développer de nouveaux traitements contre le cancer. Nous disposons de différents vecteurs (Anticorps, affinités, liposomes, etc...) et de plusieurs radioéléments (Astate 211, Iode 131, zirconium, Yttrium 90 Scandium 47, cuivre 64 etc...), certains connus qui servent de références et des nouveaux, produits en particulier par le cyclotron Arronax.

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. 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. Deux types de modèles seront utilisés par injection de cellules tumorales chez le rongeur. Ces deux procédures permettent de réaliser les premiers tests d'efficacité d'une molécule en cours de développement sur un modèle animal simple, à savoir l'injection sous-cutanée de cellules tumorales de souris chez la souris immunocompétente (modèles syngéniques) et de cellules tumorales humaines chez la souris immunodéprimée (xénogreffes) Nous réalisons des images de ces souris par différentes méthodes (bioluminescence, PET-Scan, PET-IRM) avant et après les radio-immunothérapies vectorisées qui nous permettent de mesurer l'efficacité du traitement et sa toxicité sur les tissus sains.

Selon notre historique, nous estimons mener 5 études par an, soit 25 études sur 5 ans. Sachant que 30 à 70 animaux sont utilisés par étude, nous estimons que 1750 souris seront utilisées au maximum sur 5 ans. Le nombre de souris varie en fonction du nombre de groupes 3 à 7 avec 10 animaux par groupe (Un groupe contrôle, un groupe traitement de référence et 1 à 5 groupes par dose testée). En tant que plateforme, nous réalisons des prestations de services. Par conséquent, nous sommes amenés à travailler sur différentes souches de souris, mais dont le phénotype ne sera pas dommageable. Pour les modèles syngéniques souches C57Bl6, Balbc, ou KAlwrij. Pour les modèles de xénogreffes souches NMRI nude, SCID Beige ou NSG (en fonction du degré d'immunosuppression requis).

Nos études seront planifiées pour respecter au mieux la règle des 3R pour Remplacer la pathologie cancéreuse étant une pathologie complexe, il n'existe pas à ce jour de méthodes alternatives à l'expérimentation animale. Toutefois, les principes actifs seront préalablement testés *in vitro* afin de réduire le nombre de candidats à tester *in vivo* en excluant les candidats les moins prometteurs. Réduire pour chaque étude, le nombre d'animaux utilisés est réduit à un minimum acceptable pour l'obtention d'informations robustes et statistiquement pertinentes. Raffiner l'apport de l'imagerie permet d'une part de raffiner les modèles animaux existants et d'autre part de développer et proposer des modèles *in vivo* toujours plus proches des situations cliniques. Les animaux seront hébergés selon la réglementation en vigueur avec un enrichissement du milieu. L'état général et clinique des animaux sera surveillé de façon quotidienne pour estimer une éventuelle gêne ou

douleur. L'évaluation journalière permettra la mise en place et l'ajustement de traitements analgésiques (Ains (métacam) +/- buprénorphine).

14493 En France, 385 000 cas de cancer sont diagnostiqués chaque année, le cancer représentant la première cause de mortalité chez les hommes et la seconde chez les femmes. Ces trente dernières années, l'émergence de nouvelles technologies a permis de caractériser en profondeur les tumeurs ainsi que leurs infiltrats de cellules immunitaires. La génération d'un environnement immunosuppresseur au sein des tumeurs est le point de départ de l'échappement des cellules tumorales à l'immunosurveillance. Les immunothérapies ont pour but de restaurer cette surveillance immunitaire en recréant un environnement favorable au recrutement et à l'activation des cellules du système immunitaire infiltrant la tumeur. Le présent projet s'inscrit dans cette dynamique thérapeutique.

Siglec9B est un récepteur exprimé par différentes cellules immunitaires (principalement les cellules Natural Killer (NK), et les cellules myéloïdes). Après interaction avec ses ligands acides sialiques qui sont fortement exprimés sur les cellules tumorales, Siglec9B inhibe les fonctions effectrices des cellules immunitaires, réduisant l'efficacité de la réponse anti-tumorale.

Notre laboratoire a développé différents anticorps bloquants qui ciblent Siglec9B en fonction de leur épitope et qui ont montré leur capacité à restaurer la fonctionnalité des cellules lymphocytaires et myéloïdes dans des tests *in vitro*. Le but du présent projet est de démontrer, dans des modèles murins, que ces anticorps, utilisés comme seuls agents thérapeutiques ou combinés avec des chimiothérapies ou d'autres anticorps déjà approuvés en clinique (anti-PD1 ou anti-PD-L1) ont une activité anti-tumorale et de choisir parmi eux le meilleur candidat thérapeutique. Les systèmes de régulation des cellules immunitaires de l'homme et de la souris présentant de nombreuses analogies fonctionnelles, la souris apparaît comme le modèle animal le plus pertinent. L'orthologue murin de Siglec9B, SiglecE, est exprimé seulement sur les cellules myéloïdes et est absent sur les cellules NK. Pour pouvoir tester nos anticorps anti-Siglec9B dans le modèle murin, nous avons généré des souris génétiquement modifiées qui expriment Siglec9B dans les cellules NK (souris KI huS9/moNKp46) et des souris qui expriment Siglec9B à la place de SiglecE dans les cellules myéloïdes (souris KI huS9/moSE).

Dans ce contexte, afin de respecter la règle des 3 R

- Remplacer et Réduire le nombre nécessaire de souris a été calculé afin de couvrir les différentes études qui permettront d'investiguer les effets anti-tumoraux du blocage de Siglec9B et de fournir des résultats statistiquement significatifs. Les données obtenues pour chaque paramètre sur des animaux traités pourront être comparées aux données obtenues sur des animaux ayant reçu un traitement placebo et/ou un traitement de référence et permettre ainsi l'évaluation précise de l'efficacité de nouveaux candidats médicaments.

Le remplacement des animaux est impossible à mettre en place du fait de la nécessité d'étudier l'efficacité dans un modèle *in vivo* complexe, impossible à mimer *in vitro*.

- Raffiner Afin de limiter le stress, les animaux sont hébergés de 2 à 5 par cage avec 2 enrichissements de milieu, au minimum.

Dans le cas d'inflammation légère au niveau du site d'injection des cellules tumorales, un nettoyage topique sera effectué.

De plus, les prélèvements sanguins seront réalisés sous anesthésie générale (gazeuse à l'isoflurane) et les volumes ainsi que les fréquences de prélèvement suivront les recommandations du CEEA.

Les points limites relatifs à la perte de poids, à l'apparence et au comportement des animaux (prostration, poils piqués, isolement, difficultés respiratoires (dyspnée), paralysie, etc.), à l'aspect et aux volumes des tumeurs (nécrose, volume supérieur ou égal à 1800 mm³), sont des critères qui justifieront le sacrifice des animaux.

Le présent projet consiste à valider l'efficacité anti-tumorale du blocage du récepteur Siglec9B. Nous envisageons d'évaluer l'efficacité des anticorps reconnaissant le récepteur Siglec9B dans des

souris génétiquement modifiées (souris KI huS9/moNKp46 et souris KI huS9/moSE) porteuses de tumeurs.

Le projet s'articulera en plusieurs étapes

- une première étape visant à évaluer les paramètres de pharmacocinétique et de pharmacodynamie des anticorps dans le sang périphérique des animaux. Le but est d'optimiser les protocoles d'administration des anticorps pour les étapes ultérieures d'efficacité
- dans un second temps, l'efficacité anti-tumorale des anticorps anti-Siglec9B, seuls ou en combinaison avec d'autres anticorps thérapeutiques ou avec des chimiothérapies sera évalué sur des souris porteuses de tumeurs. Différents modèles de tumeurs seront utilisés les cellules tumorales seront greffées soit par en sous-cutanée (SC), soit en intraveineuse (IV).

Le nombre total d'animaux est évalué au maximum à 13876 sur 5 ans.

14494 Le cancer du foie est une maladie en pleine expansion avec actuellement plus de 8500 nouveaux cas par an en France et plus de 7000 morts par an. En dehors des causes classiques provoquant une inflammation du foie comme les virus, l'inflammation sur foie surchargé en lipides (stéatosique) est une maladie qui prend de plus en plus d'importance dans les pays développés. Cette maladie est due à l'association de plusieurs facteurs comme l'obésité, le diabète, l'alcool, ou le manque d'oxygène résultant de la maladie de l'apnée du sommeil. L'apnée du sommeil apparait également chez des personnes en situation d'obésité et augmente la mortalité chez les personnes atteintes d'un cancer. De plus, à ce jour le seul traitement approuvé pour le cancer du foie (carcinome hépatocellulaire, CHC) est le sorafenib. Cependant, ce traitement ne permet qu'une modeste amélioration de la survie et entraîne souvent des effets secondaires qui altèrent la qualité de vie du patient. Il existe un besoin urgent de thérapies nouvelles, efficaces et sûres. Puisque les désordres métaboliques impliquent plusieurs organes, il est essentiel d'utiliser un modèle d'animal avec un CHC qui associe tous les désordres sous-jacents observés chez le patient. Dans les phases de tests précliniques futurs, cela permettra d'étudier l'efficacité des médicaments sur les tumeurs, mais aussi la tolérance/toxicité du traitement.

Nous proposons d'utiliser un modèle combinant l'administration d'un régime de type « Western Diet » (WD, riche en graisse et en sucre et boisson sucrée), avec de l'alcool et/ou un agent génotoxique (DEN, diethylnitrosamine) Ce modèle permettra d'étudier l'impact de l'apnée du sommeil sur le développement et la progression du CHC sur le foie stéatosé d'un animal chroniquement alcoolisé et de le proposer comme modèle pré-clinique. Enfin, Ce modèle permettra aussi de déterminer les mécanismes moléculaires sous-jacents pour définir des cibles moléculaires thérapeutiques.

Ce projet a été conçu dans une démarche éthique et avec une application du principe des 3R telle qui s'en suit.

Remplacer le développement du cancer du foie est un processus qui implique différents types cellulaires au sein du foie et la maladie du foie stéatosé associe plusieurs facteurs, dont des perturbations métaboliques systémiques. Les lignées de cellules cancéreuses humaines du foie ne permettent pas de reproduire tous ces processus, en partie multi-organes. L'utilisation du modèle animal n'est donc pas pour l'instant remplaçable dans ce type d'étude.

Raffiner les animaux seront hébergés en groupes avec un enrichissement du milieu. Un suivi quotidien des animaux sera réalisé. Nous caractériserons en profondeur ces nouveaux modèles animaux afin de déterminer la prédominance du CHC. Cette approche représente un raffinement essentiel des modèles *in vivo* de carcinogenèse hépatique. Le raffinement des 3R s'étend donc au-delà de ce projet avec un impact fort sur la méthodologie à venir et la transposition des résultats à l'homme. L'utilisation d'anesthésiants et/ou analgésiques sera réalisé comme décrit dans les procédures afin de prévenir et/ou réduire au minimum la douleur, la souffrance et l'angoisse dans le cas où elles surviendraient.

Réduire Ces mises au point de modèle permettra de nous préparer pour des études précliniques ultérieures avec le meilleur modèle et ainsi de réduire le nombre d'animaux utilisé dans les phases précliniques De plus, un calcul des effectifs nécessaires basé sur une variable biologique simple (incidence de CHC) nous permettra d'atteindre une significativité des résultats avec un minimum

d'animaux. Notre approche statistique est basée sur la comparaison de deux moyennes. Enfin, l'exposition à l'HI sera réalisée uniquement sur le groupe de rats présentant la pathologie hépatique la plus pertinente. Des prélèvements post-mortem seront réalisés et conservés pour des études ultérieures.

Nombre d'animaux pour ce projet 205.

14495 La communauté scientifique utilise la souris comme modèle animal pour faire progresser la recherche biologique et médicale.

Notre service a pour but de cryoconserver, de revivifier et décontaminer les modèles murins expérimentaux génétiquement modifiés à la demande des équipes de recherches.

Notre laboratoire propose donc différentes prestations

1. La conservation de lignées murines sous forme d'embryons ou de sperme.

Ces précieux modèles correspondent à des lignées transgéniques génétiquement modifiées obtenues par techniques de transfert et d'inactivation géniques. Modèles non disponibles dans les établissements fournisseurs d'animaux de laboratoire.

l'archivage des lignées permet

-d'éviter le maintien inutile sous forme respirante des lignées quand le chercheur a fini son étude.

-de redémarrer à tout moment un élevage si besoin.

-de faire une biobanque pour bénéficier de modèles animaux déjà existants pour l'ensemble de la communauté scientifique.

La conservation des lignées se fait dans l'azote liquide à -196°C , sous forme soit d'embryons soit de sperme congelés.

En fonction des fonds génétiques nous congelons de 150 à 350 embryons par lignées, dans des paillettes.

Pour le sperme à partir d'un mâle nous faisons 10 paillettes.

2. La décontamination des lignées murines

La décontamination est indispensable pour ôter l'influence de contaminants sur une expérimentation. Elle est également nécessaire pour échanger en toute sécurité une lignée avec un collaborateur en fonction du statut sanitaire des animaleries respectives.

Elle permet de débarrasser de tous virus, bactéries et parasites les lignées qui rentrent dans les zones de production. Les lignées décontaminées ont un statut SOPF (Spécific, Opportunist, Pathogen, Free) permettant le maintien d'un statut sanitaire. Cela permet aussi

-aux chercheurs de travailler sur des sujets sains

-des résultats reproductibles

-d'avoir des animaux en bonne santé

-de respecter le bien-être animal

3. La reviviscence des lignées murines

Elle se fait soit à partir de sperme ou d'embryons. La reviviscence permet

-de faire repartir la lignée sous sa forme respirante rapidement.

-de limiter au maximum les risques de contamination dans les services de zootechnie, les nouvelles lignées sont introduites par transfert d'embryons. Elle est également nécessaire pour échanger en toute sécurité une lignée avec un collaborateur en fonction du statut sanitaire des animaleries respectives.

La revitalisation permet d'obtenir des animaux de statut sanitaire exempt de pathogènes spécifiques et opportunistes (SOPF) et cette technique est utilisée pour limiter la dérive génétique et revitaliser le phénotype original de la souche commandée.

Au total sur 5 ans pour réaliser toutes les prestations nous allons utiliser 6450 animaux (souris).

Notre activité entre pleinement dans la démarche des 3R :

Réduire Notre travail de recherche et de développement nous a conduit à proposer la prestation de congélation de sperme, ce qui nous a permis de diminuer et réduire considérablement le nombre de souris utilisées. Avec seulement un individu nous pouvons archiver une lignée. Cette démarche reste une de nos priorités que nous proposons à nos clients.

La cryoconservation permet de supprimer des lignées respirantes soit en fin de projet de recherche soit pour les lignées non utilisées dans le service de production.

Ce panel de techniques nous permet de cibler la démarche la mieux adaptée pour prioriser la réduction du nombre d'animaux à utiliser.

Les avantages de ces techniques sont multiples et permettent de réduire le nombre de souris élevées pour rien lors de maintien des lignées respirantes.

Raffiner Les actes chirurgicaux, sont réalisés sous anesthésie générale chimique, avec une analgésie péri-opératoire. Une surveillance journalière sera effectuée et permettra le contrôle post-opératoire (sutures, cicatrifications) et de suivre les signes extérieurs de souffrance (léthargie, poil hérissé, ou comportement associatif) dont l'apparition entraînera une prise de décision par le vétérinaire référent du laboratoire.

Les points limites seront

-Comportement (observation quotidienne) : perte de dynamisme, prostration

-Apparence physique externe (observation quotidienne) : yeux plissés, poils hérissés, oreilles en arrière

-Paramètres physiologiques (mesure hebdomadaire) variation du poids de l'animal avec perte supérieure à 20%

-Rupture des sutures, retard de la cicatrisation, infection (observation quotidienne)

Nos souris sont maintenues dans des cages spacieuses, ventilées avec le contrôle permanent des facteurs environnementaux. De l'enrichissement est distribué dans chaque cage, avec des igloos et des cylindres de cotons pour la fabrication des nids, des jouets en bois pour les mâles seuls.

Remplacer Depuis peu nous avons mis en place un contrôle de viabilité *in vitro* des embryons, des lignées archivées. Après décongélation d'une paillette, le développement des embryons est suivi *in vitro* (en incubateur à 37°C, à 5% de CO₂) jusqu'au stade blastocyste. Puis un test de génotypage est effectué par l'équipe de recherche pour contrôler les modifications génétiques.

Ce test remplace le test *in vivo* qui consiste à décongeler et réimplanter les embryons dans des femelles porteuses, jusqu'à la naissance des souriceaux.

14496 Le glaucome à angle ouvert correspond à une altération des fibres nerveuses de la tête du nerf optique (papille) liée à l'âge, responsable d'une détérioration irréversible du champ visuel pouvant conduire à la cécité. Les glaucomes représentent la seconde cause de cécité dans le monde. La physiopathologie est complexe et multifactorielle, la pression intraoculaire (PIO) élevée restant le principal facteur de risque et le seul accessible à un traitement. Ceux-ci visent principalement à réduire la PIO afin de préserver la fonction visuelle, soit par voie médicale (collyre ou laser), ou chirurgicale si le traitement médical est insuffisant.

Le traitement chirurgical de référence reste la trabéculéctomie, et consiste à créer une valve naturelle entre la chambre antérieure de l'œil et les espaces sous-conjonctivaux pour permettre l'évacuation de l'humeur aqueuse secrétée en excès. Le pronostic de cette chirurgie est conditionné par le développement post-opératoire d'une bulle de filtration pérenne mais peut être compromis par une fibrose excessive nécessitant une ré-intervention délicate et plus complexe. Des traitements réduisant la prolifération fibroblastique excessive existent, avec principalement l'usage de l'antimitotique Mitomycine C (MMC), mais exposent le patient à de nombreux effets secondaires (infection, cataracte précoce, hypotonie sévère) et posent la question d'alternatives thérapeutiques. Nous avons montré dans le cadre d'études préliminaires menées *in vitro* l'efficacité de l'acide docosahexaénoïque (DHA), qui est un acide gras polyinsaturé oméga-3, sur la prévention de la différenciation et la prolifération de fibroblastes issus d'yeux humains. L'objectif de la présente étude

est de valider l'usage du DHA en conditions *in vivo* chez un modèle animal de fibrose post-chirurgicale du glaucome.

Pour cela, nous utiliserons trois groupes de 12 rats, pour un total de 36 animaux, sur lesquels nous induirons la formation d'une bulle de filtration sous-conjonctivale. Un groupe de rats sera traité quotidiennement pendant 21 jours avec un collyre contenant un placebo (larmes artificielles), un autre avec un collyre à base de DHA, alors que le troisième consistera en un contrôle positif et sera exposé de façon transitoire à la MMC au moment de la chirurgie (de la même façon qu'en pratique clinique). Nous évaluerons à la fois la formation, la persistance et la vascularisation de la bulle de filtration, mais aussi les mécanismes moléculaires de différenciation et prolifération des fibroblastes. La mise en œuvre du projet s'inscrit dans la règle des 3R.

Réduire Nous avons abordé ce projet à travers des études *in vitro* dont le but a été d'obtenir un grand nombre d'informations (type d'acide gras oméga-3 à utiliser, doses, mécanismes moléculaires à étudier). Ceci a permis de cibler les objectifs de la présente étude et d'en réduire le nombre de groupes expérimentaux. Pour chacun d'entre eux, le nombre d'animaux sera diminué à 12, qui est nombre minimum nécessaire afin de pouvoir évaluer correctement et de façon fiable les mécanismes de différenciation des fibroblastes, ceci compte-tenu de la variabilité généralement observée dans ce genre d'analyses.

Raffiner Chaque procédure sera réalisée en réduisant ou supprimant la douleur, en limitant la souffrance et le stress des animaux. A cette fin, des anesthésiques seront utilisés lors de l'induction de la bulle de filtration ainsi que les étapes d'imagerie. L'unité dans laquelle le projet sera réalisé dispose d'une Structure chargée du Bien-Etre Animal qui veillera et veille, tout comme les expérimentateurs, aux conditions optimales de réveil après anesthésie.

Remplacement L'œil est un organe très complexe composé de structures neuronales et non neuronales, elles-mêmes associées à des éléments des systèmes vasculaire, lymphatique et conjonctif. Le fonctionnement coordonné de toutes ces structures assure la fonction globale de sécrétion et élimination de l'humeur aqueuse. Seule une étude macromorphologique du globe oculaire sur un modèle animal peut rendre compte des paramètres évalués.

14497 De la diarrhée est souvent observée chez les porcelets dans les jours qui suivent la séparation de leur mère à 21 ou 28 jours d'âge. Ces troubles s'expliquent principalement par un déséquilibre de leur flore intestinale. L'usage d'antibiotiques permet de prévenir ou traiter ces désordres. Or, dans la perspective de promouvoir des systèmes d'élevages durables, diminuer l'usage de ces antibiotiques est un enjeu majeur.

La dynamique et la diversité de la flore intestinale, en fonction de l'âge et des conditions de sevrage des animaux, font l'objet d'un projet de recherche financé par l'Agence nationale de la recherche (ANR). Les investigations réalisées en élevage ont permis d'établir une relation entre la composition de la flore intestinale et la robustesse des porcelets au moment du sevrage. Deux mélanges bactériens, spécifiques du niveau de robustesse des animaux, ont été identifiés.

Cette saisine se situe dans le prolongement de ce travail d'identification. Elle propose d'étudier l'impact de ces deux flores sur des porcelets de 21 jours, âge moyen au sevrage habituellement appliqué en élevage. Les mélanges bactériens seront administrés à 24 porcelets exempts d'organismes pathogènes spécifiés (12 porcelets par mélange) et élevés pendant 14 jours dans des animaleries (une flore par animalerie). Quatre porcelets seront affectés à un groupe témoin. L'état de santé des animaux sera apprécié par des examens cliniques (température rectale, prise de poids, niveau de consommation d'aliment, note de léthargie, d'anorexie, de déshydratation et de diarrhée). Des prélèvements de fèces seront réalisés quotidiennement. Les porcelets seront euthanasiés et autopsiés après 14 jours d'expérimentation. Divers prélèvements biologiques seront réalisés afin d'apprécier l'implantation de ces flores et la réponse immunitaire intestinale.

La procédure sera conduite dans le respect de la règle des 3R réduction du nombre d'animaux utilisés (28 porcelets) au seuil de la pertinence statistique ainsi que le raffinement des conditions d'hébergement (plaque de couchage et lampe chauffantes, présence d'objets manipulables dans

les parcs, etc.). Le remplacement n'est pas envisageable, les animaux étant nécessaires pour la réalisation de cette étude.

14498 Durant les trois dernières décennies, la prévalence des allergies a fortement augmenté. En 2016, 25 à 30% de la population des pays industrialisés souffraient d'allergie. Et on estime que 40 à 50% des européens présenteront une allergie en 2040.

Actuellement, il existe des médicaments permettant le traitement des symptômes de l'allergie, comme les corticoïdes et les antihistaminiques. Certains de ces médicaments sont obtenus à partir des poumons de cobayes.

Le projet consiste à produire des poumons de cobayes, ayant subis un choc anaphylactique. A ce jour, il n'existe pas de méthode alternative pour la production de ces médicaments, que celle utilisant les animaux.

Pour ce projet, le nombre d'animaux utilisés est déterminé par le poids de poumons nécessaire pour la production du médicament. Ce poids dépend de la demande du commanditaire, et pourra être différent entre les études de production. Sur toute la durée du projet, le nombre d'animaux utilisés est estimé à 50 cobayes jeunes adultes. Après une phase d'immunisation, qui est indolore, nous provoquerons une réaction allergique chez les cobayes. Cette réaction se déroulera totalement sous anesthésie générale, afin de prévenir toute souffrance. Les animaux ne seront pas réveillés suite à la réaction.

Les animaux seront hébergés en groupes sociaux compatibles. Les cages seront équipées de litières, et d'enrichissement, tels que du matériel à ronger et des objets, permettant aux cobayes de se cacher. L'hébergement tient compte des contraintes de biosécurité du laboratoire. Tout sera mis en œuvre pour respecter le bien-être des animaux.

14499 La chirurgie mini-invasive (CMI), qui permet d'opérer par petites -ou sans- incisions à l'aide d'instruments fins et de mini-caméras, poursuit sa révolution en salles d'opération avec des champs d'application de plus en plus étendus.

L'essor de ces techniques mini-invasive est aussi le fruit du développement de l'imagerie médicale qui offre de nouveaux espoirs de traitement pour de nombreuses maladies bénignes ou malignes du tractus gastro-intestinal.

Les avantages de la CMI sont multiples pour le patient : moins de saignements, de douleurs, de risques infectieux et donc moins de complications, des cicatrices réduites et une durée d'hospitalisation raccourcie.

Mais le développement de ces approches innovantes (laparoscopie, endoscopie, échographie, chirurgie percutanée, abords endovasculaires guidés par l'image, robotique...) pose, comme pour toute nouvelle technologie, la question de l'apprentissage et de l'évaluation des compétences.

L'objectif de ce projet est de développer des modèles et de former les professionnels de santé humaine ou animale aux nouvelles techniques en chirurgie mini invasive guidée par l'image. Les formations proposées sont évaluées par un comité d'experts et peuvent être diplômantes à différents niveaux universitaires (DU, Masters...).

Pour cela, 1270 porcs, 30 rats et 30 souris seront nécessaires sur 5 ans pour former aux techniques mini-invasives plus de 1500 chirurgiens et autres professionnels de santé (gastro-entérologues, urgentistes, anesthésistes, radiologues, IBODE, vétérinaires...), dans le respect de la règle des 3R

Remplacement : La formation chirurgicale est traditionnellement constituée d'un apprentissage où le stagiaire apprend à opérer sous la supervision d'un chirurgien formé.

En complément de cette approche par tutorat, l'entraînement pratique reste un élément clé pour accélérer la maîtrise de nouveaux gestes et dispositifs sans exposer les patients à des risques inutiles.

Nous développons et proposons différents parcours de formation dans un environnement de bloc opératoire hybride.

Les cours se structurent en sessions alliant théorie, cas cliniques, retransmission d'opérations en direct et sessions pratiques sur des modèles dont la nature diffère selon les objectifs éducatifs poursuivis et la complexité des gestes et techniques à enseigner.

Dans le respect des 3Rs, les apprentissages sont initiés sur modèles alternatifs dont la liste est en évolution perpétuelle sous l'impulsion des actions de recherche de nos équipes : simulateurs virtuels, mannequins, dispositifs ex vivo, organes isolés....

Ces modèles ont des limitations et les programmes d'enseignement les plus avancés nécessitent le recours à l'animal qui, de par ses caractéristiques physiologiques et anatomiques très proches de l'être humain, reproduit les conditions et les contraintes réelles de l'acte qui est enseigné. Les risques d'une voie d'abord, les complications et les répercussions physiologiques et anatomiques d'un geste, d'une technique ou d'une technologie ne peuvent être appréhendés, et dès lors anticipés et enseignés, que grâce à un modèle in-vivo.

Le porc, de par sa taille, son anatomie et sa physiologie, est le modèle animal le plus pertinent pour enseigner la chirurgie mini-invasive permettant de reproduire/expérimenter les voies d'abord, les techniques opératoires, l'instrumentation et les technologies utilisées chez l'homme. Il est également possible de simuler certaines pathologies (obstructions, dilatations, collections, tumeurs), mais aussi les difficultés d'abords chirurgicaux (vascularisation, innervation, repères anatomiques variables), les complications liées au geste chirurgical (saignements, viabilité des organes, état de choc...), et d'acquérir les images radiologiques générées par différentes sources utilisées en médecine (optique, rayon X, IRM...).

Le petit animal (rongeurs) sera utilisé dans certains enseignements quand les techniques ne requièrent par une taille équivalente du modèle pour les instruments. Il s'agira par exemple de formations s'appuyant sur de nouvelles techniques d'imagerie comme la fluorescence peropératoire (Endomicroscopie Confocale) qui permettent d'obtenir en temps réel des informations sur le tissu examiné au cours d'une procédure endoscopique ou chirurgicale.

Réduction : Les cours sont dispensés sur plusieurs jours avec des sessions théoriques et pratiques, les sessions pratiques se déroulent sur modèles alternatifs et sur modèle animal.

1 animal permet en moyenne de former 1 à 2 professionnels à plus d'une dizaine de procédures sur différents organes.

Chaque cours accueille environ 30 stagiaires, à raison de 10 sessions de formation par an, tous thèmes confondus, 1270 porcs sera le nombre maximal nécessaire sur les 5 ans du projet. Sont inclus dans cet effectif un petit nombre d'animaux qui seront utilisés pour tester et améliorer les modèles au regard de l'état de l'art médical et de l'évolution des technologies. Tous les moyens seront mis en œuvre pour réduire le nombre d'animaux, à savoir recherche et développement de modèles alternatifs, réalisations de plusieurs procédures par animal sur un même temps opératoire, mutualisation des sujets entre stagiaires, collecte d'organes pour formation ex vivo.

Raffinement : Toutes les interventions se font sous anesthésie générale profonde avec traitement de la douleur. Les animaux sont euthanasiés en fin de session de cours, sans réveil de l'anesthésie. Au préalable aux interventions chirurgicales, les animaux sont maintenus en groupe social dans un environnement contrôlé en température et hygrométrie. Ils reçoivent une alimentation adaptée à leurs besoins, de l'eau à volonté, des jouets et dispositifs favorisant leurs comportements naturels comme le fouissage et mâchouillement.

Une équipe compétente composée de zootechniciens, vétérinaires et chirurgiens assure au quotidien l'entretien, la surveillance et les soins des animaux. La Structure en charge du bien-être animal accompagne la mise en œuvre des expériences. Avec le vétérinaire désigné, elle conseille les responsables de cours dans l'amélioration de leurs pratiques en faveur du bien-être des animaux et de l'application des 3R.

14500 Les maladies démyélinisantes inflammatoires telles que la sclérose en plaque ou les Polydicolonévrites inflammatoires démyélinisantes sont des pathologies du système nerveux résultant de l'attaque des nerfs par ses propres anticorps (maladie auto-immune).

Ces maladies touchent plusieurs millions de personnes à travers le monde. Elles se manifestent par l'apparition de faiblesses musculaires progressives pouvant évoluer vers des troubles musculaires importants. Ces maladies sont chroniques, avec des phénomènes de « poussées » (phases de rémission suivie de phases de rechute) pouvant entraîner des lésions irréversibles.

Les traitements actuels de ce type de pathologies sont basés sur une réduction des réactions inflammatoires des nerfs attaqués par le système immunitaire. Ces stratégies thérapeutiques n'ont pas de but curatif mais ont pour objectif d'atténuer les symptômes. Tous les patients ne répondent pas aux traitements disponibles actuellement et des effets secondaires importants peuvent être rencontrés avec les traitements anti-inflammatoires chroniques. De nouvelles approches thérapeutiques sont donc nécessaires et doivent être évaluées sur des modèles expérimentaux avant de pouvoir être mises en application chez l'Homme.

Le principe des modèles animaux permettant de reproduire une maladie auto-immune type sclérose en plaque consiste à injecter chez un animal (souvent le rat), un cocktail d'éléments présents dans la composition des nerfs. Ces protocoles consistent à faire produire des anticorps contre certaines protéines présentes dans les nerfs afin de déclencher des réactions inflammatoires. Ce modèle permet de reproduire les principaux signes cliniques de ces maladies dont notamment les phénomènes de poussées suivi des phases de rémission. Les nouveaux candidats médicaments peuvent alors être évalués sur la base de l'évolution des troubles chez l'animal et par une approche histologique de l'état des nerfs.

Ce projet fait suite à une étude de faisabilité qui a permis la mise en place et la validation d'un modèle de maladie démyélinisante chez le rat. Il a pour but de tester un nouveau candidat médicament permettant de moduler la réaction immunitaire, sans les effets secondaires rencontrés avec les traitements anti-inflammatoires actuellement disponibles. Ce projet impliquera un maximum de 80 animaux, ce qui correspond à un effectif minimum permettant de réaliser une évaluation des effets bénéfiques du candidat médicament dans ce type de modèle.

L'étude de faisabilité et son analyse rétrospective ont permis de valider ce nombre minimum d'animaux ainsi que l'application de la règle des 3Rs et les points limites.

Concernant la règle des 3Rs

- les animaux bénéficient d'un enrichissement de leur milieu d'hébergement (jouets, objets à ronger, incitation au foussement).
- l'induction du modèle est réalisée sous anesthésie
- le nombre d'animaux par groupe est réduit au minimum pour permettre la détection des effets recherchés.
- actuellement, il n'existe pas de méthodes alternatives permettant d'obtenir toutes les informations collectées grâce à ces études.
- pour améliorer la prise alimentaire, l'aliment est broyé et humidifié et placé dans la cage. De plus, un gel sucré est mis à disposition des animaux dès les premiers symptômes.
- des soins quotidiens seront réalisés au niveau des sites d'injections avec application d'une solution antiseptique (Biseptine) afin de limiter le risque d'infection.

Ce projet est classé avec un degré de sévérité sévère lié aux troubles musculaires pouvant déboucher sur des phénomènes de paralysie.

Les points limites pour ce projet sont

- Amaigrissement marqué (>20% par rapport au jour de l'induction)
- Perte d'appétit ou incapacité à se nourrir et s'abreuver par la mise en place d'un suivi quotidien de la prise alimentaire
- Douleurs observées par des cris et/ou agressivité de l'animal lors de la manipulation
- Apparition de lésions cutanées infectées et jugées non résorbables avec de simples soins vétérinaires. Ces lésions peuvent être consécutives à une paralysie prolongée, à de l'automutilation ou à la réaction inflammatoire déclenchée par l'injection du cocktail d'induction du modèle.

Ce type de modèle est requis par les autorités réglementaires comme preuve de concept de nouvelles approches thérapeutiques en préalable aux essais cliniques chez l'Homme. Le présent projet a pour objectif d'évaluer le modèle sur un nombre limité d'animaux. Le nombre d'animaux maximum prévu pour ce projet est de 80 rats.

14501 Notre recherche s'intéresse au rôle fonctionnel d'une population neuronale de l'hippocampe. Cette structure présente en effet la particularité de créer des neurones tout au long de la vie, ce qui soulève de nombreuses questions quant à l'intégration des cellules dans la structure, leurs propriétés ou encore leur relevance fonctionnelle.

Pour répondre à ces questions nous mettons en œuvre des procédures expérimentales nécessitant un apprentissage afin d'atteindre un niveau d'expertise compatible avec les expériences et le respect de la règle des 3R. Le but de ce projet est donc la formation des nouveaux entrants à ces procédures. Nous estimons le nombre d'animaux nécessaire à 360 souris sur 5 ans.

Afin de respecter la règle des 3R, des procédures seront développées de façon à réduire au maximum le nombre et l'inconfort des animaux. Notamment, dans un souci de respect du R de réduire, nous pratiquerons autant que possible plusieurs procédures sur le même animal et n'utiliserons que des animaux réformés (anciens reproducteurs), non utilisés pour raison génétique, ou des animaux excédentaires. Dans un souci de Raffinement, les séquences d'apprentissage seront organisées de façon à réduire au maximum l'inconfort des animaux et l'encadrant référent portera une attention particulière à la réalisation des procédures afin de limiter la douleur, de soulager le stress des animaux et leur fournir les meilleures conditions de vie tout au long du projet. Pour leur bien-être, les animaux vivent en groupes sociaux et ont à leur disposition des éléments d'enrichissement de leur milieu. L'ensemble des animaux est surveillé quotidiennement avec une surveillance renforcée au cours des étapes de chirurgie, et accrue dès qu'un signe d'appel est constaté. Des traitements et dispositifs appropriés (anesthésie, anti-inflammatoire, anti-douleur, tapis chauffants) sont utilisés pour pallier la douleur associée aux opérations chirurgicales, et des points limites suffisamment précoces sont définis pour éviter des souffrances aux animaux avec la mise en place de mesures pour les soulager comme une réhydratation, le réchauffement, une nourriture adaptée, des traitements vétérinaires si nécessaire. Enfin par définition, ce projet, qui vise à former les étudiants à réaliser des gestes d'expérimentation animale ne peut être conduit sur des cultures de cellules ou de tissus et le Remplacement animal n'est pas possible.

14502 Depuis le début des années 1980, le nombre de transplantations pulmonaires est en constante augmentation, or la progression quantitative et qualitative de la greffe pulmonaire au cours des trente dernières années masque un problème crucial de pénurie d'organes. Le développement de nouvelles stratégies permettant d'augmenter le nombre d'organes disponibles répond alors à un vrai problème de santé publique.

La photobiomodulation, ou traitement par la lumière, est une thérapeutique non médicamenteuse innovante basée sur les propriétés de la lumière, connue entre autres pour limiter le stress oxydatif et améliorer les processus de cicatrisation. Dans ce contexte, la finalité du projet proposé est d'étudier si la photobiomodulation, associée à la technique d'évaluation ex vivo de greffons pulmonaires (ayant pour objectif de maintenir les poumons dans un état physiologique stable avant transplantation) améliore la viabilité des greffons pulmonaires en optimisant la résistance des greffons aux processus d'ischémie reperfusion auxquels ils sont soumis lors des étapes de prélèvement et de transplantation.

L'application clinique visée justifie le recours à des organes prélevés sur des animaux et il ne nous est pas possible d'utiliser un autre modèle expérimental. Notre expérimentation sera ainsi réalisée sur dix jeunes porcs anesthésiés, puis euthanasiés, sur lesquels seront prélevés les poumons à qualifier comme greffons pulmonaires. Dans le respect de la règle des 3R, l'effectif des animaux utilisés est limité au strict nécessaire permettant une exploitation statistique robuste de nos résultats scientifiques. Tout au long de leur séjour dans notre établissement, une attention particulière sera portée au bien-être de ces porcs qui seront hébergés en groupes sociaux de 2 ou 3 animaux dans un environnement enrichi adapté aux besoins de cette espèce. L'état de santé des porcs sera suivi

quotidiennement afin de vérifier l'absence de souffrance des animaux et ils seront habitués aux expérimentateurs pendant une semaine avant le début de l'expérimentation proprement dite afin de limiter tout stress dû aux manipulations. Lors de l'expérimentation, l'anesthésie des animaux, associée à une prémédication, permettra d'éviter tout stress et toute souffrance jusqu'à leur décès, induit sans reprise de conscience.

14503 Les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) regroupent la maladie de Crohn, pouvant concerner tout le tube digestif, et la rectocolite hémorragique (ou colite ulcéreuse), limitée aux régions du rectum et du côlon. Ces maladies se traduisent par des douleurs abdominales, des diarrhées, une perte de poids et du sang dans les selles, symptômes affectant grandement la qualité de vie des patients.

D'un point de vue expérimental, un des modèles d'inflammation intestinale couramment utilisé est l'induction d'une inflammation du côlon chez le rat.

Ce modèle tend à mimer des conditions douloureuses décrites chez l'humain, en induisant les maladies, fournissant ainsi des systèmes intégrés utiles à l'étude de situations douloureuses diverses. Il permettra d'évaluer les propriétés anti-inflammatoires de nouvelles molécules provenant de l'industrie pharmaceutique majoritairement. Les études d'efficacité anti-inflammatoire sont exclusivement réalisées chez le rat, offrant des mesures robustes et reproductibles sur la base de modèles parfaitement décrits, calibrés et admis par la communauté scientifique.

Ce projet s'inscrit dans le respect de la règle des « 3R » pour l'expérimentation animale. Si des méthodes alternatives existent lors des phases précoces de développement d'une molécule (modélisation informatique, ingénierie tissulaire, cellules souches), l'avancement de la caractérisation de la molécule d'intérêt ne permet pas à l'heure actuelle de remplacer l'étude de son efficacité chez l'animal vigile. Le raffinement est mis en place autant que possible pour éviter la souffrance et le stress des animaux (anesthésie lors de l'injection intra-rectale de TNBS, surveillance des animaux tous les jours). Enfin, pour chaque étude, le nombre d'animaux utilisés est réduit à un minimum acceptable pour l'obtention d'informations robustes et statistiquement pertinentes. Dans le cadre de ce projet, une estimation montre que le nombre d'animaux qui seront utilisés pour la totalité du projet (1 an) est de au maximum 300 rats répartis sur 6 études.

14504 Le cancer représente la première cause de mortalité en France et son incidence globale augmente chaque année en raison du vieillissement de la population, de la généralisation des techniques d'exploration et de dépistage, et de causes environnementales. Les efforts de développement de nouvelles thérapies doivent donc se poursuivre. Afin d'évaluer l'efficacité de nouvelles molécules thérapeutiques, il est indispensable de tester ces molécules chez l'animal pour plusieurs raisons

- Il n'existe pas de modèle *in vitro* pouvant remplacer complètement la tumeur dans son microenvironnement et son évolution au sein d'un organisme vivant (prolifération, invasion, dissémination). Il existe cependant des modèles d'étude de clonogénicité, de migration et d'invasion cellulaires *in vitro* qui permettent d'effectuer un premier criblage d'efficacité de molécules, mais cette efficacité doit ensuite être confirmée chez l'animal.

- Des premières preuves d'efficacité *in vivo* doivent être apportées avant de passer au stade clinique de développement de ces molécules (tests cliniques chez l'homme). De plus, nous envisageons de développer ce médicament radiopharmaceutique chez l'homme, ceci impose des tests de sécurité chez l'animal.

Ce projet utilisera des modalités d'imagerie non invasive (anatomique et fonctionnelle) pour effectuer le suivi du développement tumoral chez la souris (*Mus musculus*). Il est prévu d'utiliser 280 souris sur une période de 5 ans pour permettre l'étude du microenvironnement tumoral et les mécanismes physiopathologiques d'échappement au traitement.

La règle des 3Rs sera appliquée à ce projet selon les modalités suivantes

- Remplacement des animaux d'expérience l'utilisation des animaux en tant que modèle animal de cancer ne sera utilisé qu'en dernier recours après des tests préalables de criblage et d'efficacité *in vitro*.

- Réduction du nombre d'animaux Le design de l'étude étant un plan d'expérience contrôlé en mesures répétées, le nombre d'animaux est réduit à 20 animaux par groupe. De plus, l'exploration par imagerie permettra d'effectuer un suivi longitudinal des animaux (mesures répétées à intervalles réguliers).

- Raffinement une évaluation quotidienne du bien-être animal et des points limites (poids, état d'hydratation, comportement de l'animal, état des lésions induites) sera réalisée et un enrichissement du milieu sera fait dans les cages des animaux. De plus, l'utilisation de modalités d'imagerie non-invasive innovantes permettra de limiter considérablement toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage que pourraient ressentir les animaux.

Ainsi, l'objectif de ce projet, par imagerie non-invasive, est de mieux comprendre les variations du microenvironnement tumoral avec une imagerie en condition basale et en condition de traitement afin d'explorer les mécanismes de résistance aux traitements. Cette étude permettra de valider de nouveaux outils (radiotraceurs outils logiciels analyses cinétiques analyses quantitatives) permettant d'étudier ce microenvironnement pour améliorer le développement thérapeutique contre cette pathologie grave.

14505 Le cancer demeure la principale cause de mortalité au monde. Les cancers localisés dans les muqueuses comme le cancer du poumon sont des cancers très résistants aux traitements conventionnels (chimiothérapie, radiothérapie). Le cancer du poumon peut survenir suite à de nombreux facteurs de risque (tabagisme, exposition à des produits cancérogènes, facteurs génétiques.). Actuellement les traitements les plus prometteurs reposent sur l'immunothérapie, qui consiste à stimuler le système immunitaire afin d'induire des réponses anti-tumorales efficaces et spécifiques.

Une des stratégies d'immunothérapie consiste à vacciner avec des peptides issus d'antigènes tumoraux. Cette vaccination va permettre d'induire une réponse immunitaire contre les cellules tumorales exprimant cet antigène. Plusieurs sous-populations de lymphocytes T contrôlent les réponses antitumorales, qui sont activées après reconnaissance de peptides dérivés d'antigènes tumoraux.

Pour développer de nouveaux vaccins, il est essentiel d'identifier les peptides issus d'antigènes tumoraux et de tester leur capacité à induire une réponse immunitaire spécifique (immunogénicité) *in vivo*. Cependant une barrière d'espèce existe en terme d'immunogénicité, en effet des peptides humains ne sont pas toujours immunogènes chez la souris. C'est pourquoi des souris dites « humanisées » ont été développées et permettent de tester l'immunogénicité de peptides humains *in vivo*. Les cellules immunitaires de ces souris expriment des molécules humaines nécessaires pour reconnaître les antigènes peptidiques humains.

Dans le cas de cancers localisés dans les muqueuses comme le cancer du poumon la voie d'administration des vaccins est importante. En effet, la majorité des vaccins est administrée par voie systémique (sous-cutanée, intramusculaire ou intradermique). Des publications ont montré que la vaccination par voie muqueuse (intranasale) induisait de plus fortes réponses immunitaires dans les poumons et protégeait plus efficacement contre des tumeurs à localisation muqueuse qu'une voie d'administration systémique. Le choix de l'adjuvant est aussi primordial car celui-ci peut influencer sur l'intensité de la réponse immunitaire en fonction du type de vaccin auquel il est associé et de sa voie d'administration.

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'immunogénicité de peptides dérivés d'antigènes tumoraux exprimés dans le cancer du poumon, administrés soit par voie intranasale soit par voie sous-cutanée, et associés avec différents adjuvants.

Seule l'expérimentation *in vivo* chez la souris, intégrant l'ensemble du système immunitaire, nous permet d'étudier et de reproduire fidèlement la réponse immunitaire.

Nous comparerons d'abord l'efficacité sur la réponse immunitaire des 2 voies d'administration de notre vaccin peptidique (voie intranasale et voie systémique sous-cutanée), associé à différents adjuvants. Puis nous étudierons l'association de notre vaccin avec un traitement, qui est actuellement utilisé en clinique dans le cancer du poumon.

L'analyse des réponses immunitaires sera analysée dans les différents organes et tissus en post mortem.

Cette étude nécessitera 384 animaux sur 5 ans

Toutes les procédures expérimentales ont été pensées et élaborées dans le respect des 3R pour obtenir des résultats statistiquement satisfaisants avec un nombre réduit d'animaux. Certains paramètres expérimentaux (stratégies vaccinales, nombres d'animaux suffisants pour des études statistiques) ont déjà été déterminés par des études précédentes et publiées. Chaque procédure expérimentale sera optimisée afin de récupérer le maximum d'échantillons possible sur le même animal pour réaliser toutes les analyses. Pour chaque procédure, des points limites et de critères d'arrêt sont définis ce qui permettra de limiter au maximum la souffrance animale et entraînera l'euthanasie anticipée de l'animal.

A terme, ce projet permettra d'identifier de nouveaux peptides antigéniques qui pourront être développés en clinique dans le cadre d'un vaccin pour le traitement des cancers du poumon.

14506 La pratique d'une activité physique régulière est aujourd'hui reconnue pour avoir des effets positifs sur notre santé. En effet, elle représente un facteur majeur de prévention de pathologies comme les maladies cardiovasculaires, les AVC (accidents vasculaires cérébraux), le diabète, le cancer mais agit également sur notre humeur et sur les maladies mentales associées comme la dépression et l'anxiété. Cependant, avec le mode de consommation de notre société actuelle, la tendance mondiale va vers la diminution du volume d'activité physique quotidienne. Par conséquent, l'inactivité physique est devenue l'un des principaux facteurs de risque pour les problèmes de santé et est à l'origine de 10% de la mortalité totale (OMS, 2015). L'inactivité physique a pour origine principale une absence de motivation pour initier et/ou maintenir l'adhésion à un programme d'activité. Elle est souvent associée à des troubles du comportement alimentaire tels que l'obésité, dans laquelle la motivation pour la prise alimentaire est bien plus importante que celle pour l'activité physique ou à l'inverse, dans l'anorexie restrictive, où la motivation pour l'exercice l'emporte sur la prise alimentaire. Ces deux exemples de pathologies montrent l'importance d'étudier la motivation pour ces deux récompenses lorsqu'elles sont placées en concurrence. Cette étude souhaite donc étudier la motivation pour l'exercice et pour la prise de nourriture en condition de choix à l'aide du modèle souris.

A l'opposé, la pratique excessive d'une activité physique peut avoir des effets négatifs. En effet, celle-ci, tout comme les substances licites (alcool, nicotine) ou illicites (cocaïne, cannabis...), active le système dit de « récompense » de notre cerveau et peut entraîner des comportements addictifs. En outre, l'addiction à l'exercice peut générer un état compulsif, ayant des conséquences négatives sur l'état psychologique et menant à des symptômes tels que l'état de « manque », la perte de contrôle et la poursuite de l'exercice malgré des blessures physiques. Malgré un intérêt croissant porté à cette pathologie et l'augmentation du nombre d'études cliniques, la cause de ce trouble est encore mal connue.

Des études précédentes ont montré l'implication du système endocannabinoïde (SEC) dans la motivation pour l'activité physique mais aucune n'a encore investigué son implication dans l'exercice compulsif. Le SEC joue également un rôle dans la prise alimentaire, cependant son implication dans le choix prolongé entre manger et courir n'a pas encore été étudiée. Ce projet vise donc à analyser ces hypothèses à l'aide de souris mutantes pour le principal récepteur cérébral des endocannabinoïdes, le récepteur CB1. Ces souris seront soumises à un apprentissage au cours duquel elles apprendront à effectuer un travail préalable (introduction du museau dans un orifice un nombre de fois prédéfini) pour avoir accès à des croquettes et/ou à une roue d'exercice.

Nous utiliserons au total 1344 souris (âgées de 7-8 semaines au début des expériences) sur 5 ans. L'espèce animale choisie est la souris, qui permet de mesurer l'impact de mutations génétiques de

protéines d'intérêt (ici, le récepteur CB1). Dans ce projet, l'utilisation d'un organisme entier est nécessaire afin d'étudier la motivation pour une récompense et aucune méthode *in vitro* ou *in silico* ne peut donc la REMPLACER. En respect du principe des 3Rs, nous avons néanmoins optimisé le protocole afin de REDUIRE au maximum le nombre de souris utilisées des tests de puissance statistique ont été employés pour calculer le plus petit nombre d'animaux par groupe nécessaire à l'obtention de résultats statistiquement exploitables. Ce nombre tient aussi compte du fait que les expériences seront réalisées deux fois de manière indépendante afin de s'assurer de la reproductibilité des résultats. En vue du RAFFINEMENT des procédures, un soin particulier est apporté aux questions relatives au bien-être animal. Les souris seront hébergées en cages individuelles dans une pièce dédiée avec régulation de la température, de l'humidité et de la luminosité. Le manque d'interactions sociales est compensé par un enrichissement des cages. Aucune des procédures impliquées dans ce projet n'induera de douleurs aux animaux.

14507 Le Métapneumovirus (hMPV), avec le Virus Respiratoire Syncytial humain (VRS) est l'un des agents pathogènes respiratoires humains les plus importants, responsable d'infections pulmonaires telles que les bronchiolites et pneumonies chez les jeunes enfants. Avec plus de 33 millions d'enfants de moins de 5 ans infectés chaque année, ce virus provoque jusqu'à 2% de décès. Le hMPV touche également les adultes avec une symptomatologie modérée pour les personnes sans pathologie sous-jacente mais peut être à l'origine d'une morbi-mortalité notable chez les personnes âgées, les sujets immuno-déprimés, les patients souffrant d'affection respiratoire ou cardiaque ou encore les personnes ayant reçus une greffe pulmonaire (favorise l'apparition de rejet).

L'inoculation du virus s'effectue par voie respiratoire, après inhalation de gouttelettes provenant des voies aériennes supérieures (générées par la toux, éternuements ou la parole) d'un sujet infecté ou après contact avec des objets souillés par des sécrétions respiratoires infectées.

Bien que le hMPV soit un véritable problème majeur de santé publique, il n'existe pas aujourd'hui de traitement prophylactique ou thérapeutique efficace et spécifique en partie du fait de l'absence de modèle animal préclinique pertinent et validé pour pouvoir développer de tels traitements. A ce jour, seuls des soins de soutien (symptomatiques) visant l'apport complémentaire en oxygène ainsi qu'une hydratation sont efficaces. Les corticostéroïdes et les bronchodilatateurs ne sont généralement d'aucune utilité, au même titre que les thérapies à base d'anticorps monoclonaux, efficaces dans certain cas d'infection par le Virus Respiratoire Syncytial (RSV). L'absence de traitement efficace contribue également à la prévalence de surinfections bactériennes avec le risque d'émergence de résistance aux antibiotiques. De plus, il devient maintenant clair que le sujet infecté ne peut être considéré isolément, mais en lien avec son écosystème microbien. En effet, un des aspects potentiellement déterminant dans la physiopathologie de ses infections virales est l'impact de l'infection ou du traitement sur le microbiote pulmonaire de l'hôte, ainsi que son degré de récupération après guérison.

En résumé, il est urgent de développer de nouvelles thérapies adaptées et spécifiques aux infections respiratoires, impliquant une administration locale par nébulisation. De plus, il est nécessaire de prouver l'efficacité de ces thérapies à empêcher la reproduction virale dans les voies respiratoires dans un modèle animal validé. Il a déjà été montré que le macaque cynomolgus est un modèle animal semi-permissif d'infection par le hMPV (et par le RSV), c'est-à-dire qu'il montre une réplication virale ainsi qu'une réponse immunitaire proche de l'homme, mais pas ou peu de symptômes de la maladie.

Dans une première procédure, cette espèce sera utilisée pour valider un modèle d'infection par le hMPV, administré par voie intra-nasale et intra-trachéale pour imiter le mode d'infection naturel. En plus du suivi classique, l'évolution de l'infection va ensuite être surveillée par frottis des voies aériennes supérieures et lavages broncho-alvéolaires, ainsi que par analyses sanguines. Ces prélèvements permettront de suivre la charge virale, l'évolution du microbiote pulmonaire, la réponse immunitaire de l'animal et l'expression génétique (transcriptomique) en réponse à l'infection. Une partie des animaux sera sacrifiée au pic théorique de l'infection afin d'identifier de possibles lésions histologiques.

La deuxième procédure impliquera l'administration d'une thérapie anti-hMPV par nébulisation, puis une infection comme dans la première procédure. Le suivi sera similaire mais allégé et raffiné en fonction des résultats de la première étude (dynamique de la virémie, présence ou non de lésion histologiques...). Les analyses permettront de voir la réponse de l'animal à la thérapie à l'infection. Les animaux de la première procédure serviront de contrôles (infectés, non traités) à ceux de la deuxième, afin de limiter le nombre d'animaux utilisés.

Remplacement : Pour valider l'efficacité de nouvelles thérapies anti-infectieuses avant de les tester chez l'Homme, il est nécessaire de les évaluer dans un modèle proche de l'Homme. Les modèles animaux sont essentiels pour comprendre la transmission et la pathogénèse des virus et pour évaluer des nouvelles thérapies. Le modèle PNH (macaque cynomolgus) est en effet considéré comme un modèle de référence dans le domaine du développement de thérapies anti-infectieuses notamment par aérosolthérapie, de par sa proximité physiologique et immunitaire avec l'homme ainsi que l'anatomie de ses voies respiratoires (posture verticale par opposition aux modèles rongeurs ou porcins) permettant de tester fidèlement l'efficacité des thérapies aérosolisées et des dispositifs médicaux associés.

Raffinement : Les animaux seront suivis individuellement et quotidiennement tout au long du projet, afin de détecter tout signe clinique anormal et tout signe de douleur et/ou détresse observation clinique bi-quotidienne, évaluation du stress et de la douleur quotidienne, suivi de la température corporelle ainsi qu'une pesée hebdomadaire. Des mesures préventives et correctives sont également définies en fonction de l'apparition de tout signe clinique de stress ou de douleur, qu'il soit lié au protocole ou non. Des points limites sont définis pour sortir l'animal de l'étude si des effets attendus ou inattendus apparaissent. Dans ce cas, le vétérinaire sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés. Les manipulations des animaux seront réalisées exclusivement par du personnel formé et compétent.

Réduction : Pour ce projet, il est prévu d'utiliser au total jusqu'à 30 macaques cynomolgus (mâles et/ou femelles) par an, soit un total de 150 animaux sur 5 ans. Ce nombre total pourrait être réduit car la procédure 1, dont le but est de mettre au point le modèle d'infection par le hMPV, ne sera répétée que dans le cas où la souche virale est différente. Ce nombre a été réduit au minimum pour obtenir des résultats interprétables et transposables à l'Homme. Les animaux utilisés proviendront d'un élevage agréé et l'ensemble du projet sera mené en accord avec la réglementation européenne et nationale.

14508 L'objectif du projet est l'obtention d'anticorps polyclonaux de chèvre dirigés contre la protéine P24 du virus HIV dans le but de produire des tests de diagnostic pour confirmer un test positif de contamination précoce par le virus HIV. Ce type de test ne peut être réalisé que par un sérum polyclonal car il s'agit de réaliser une compétition entre des anticorps présents dans les échantillons humains testés et les anticorps présents dans le test de confirmation. De par la variabilité naturelle des anticorps humains vis-à-vis du virus HIV, il est nécessaire de mettre en compétition de cette diversité un anticorps polyclonal afin d'assurer la fonctionnalité du test. Cet anticorps ne peut être obtenu qu'après immunisation d'une espèce animale.

Le nombre de chèvres envisagé est de 6 sur la base de l'expérience afin d'assurer l'obtention du volume et de la qualité nécessaire pour cet antisérum.

Les caprins sont reconnus pour être de bons répondeurs du point de vue immunologique lors d'immunisations de ce type et permettent l'obtention d'antisérum de bonne avidité et affinité.

De plus, la chèvre est un animal docile, patient, « intelligent » convenant parfaitement pour des protocoles nécessitant des prélèvements sanguins multiples et de volumes importants. Les animaux sont hébergés et soignés quotidiennement dans des conditions conformes à la réglementation.

L'antigène inoculé à l'animal est inactivé. Il déclenche donc une réponse immunitaire sans pour autant dégrader l'état sanitaire. Il s'agit d'un protocole similaire à une vaccination.

Toutefois toute dégradation éventuelle de l'état sanitaire des animaux fait l'objet d'un traitement médical mis en place par notre vétérinaire référent.

14509 Notre processus de production assure la production d'anticorps polyclonaux (AcP) pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique; il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines, des peptides ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Le système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant chacun sa spécificité, c'est-à-dire portant des récepteurs qui peuvent reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes. Les anticorps sont sécrétés par des lymphocytes différenciés après activation par l'immunogène étranger. Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope (déterminant antigénique), qui est habituellement composé de cinq ou six acides aminés ou unités de monosaccharides assemblés linéairement ou formant une structure épitopique conformationnelle. La réponse humorale polyclonale résulte de la production d'anticorps sécrétés par plusieurs populations clonales ayant diverses spécificités (pour des épitopes différents, y compris ceux situés sur une même molécule), affinités et classes, et représente donc une forme de défense efficace contre les pathogènes. Les AcP possèdent des affinités différentes pour divers épitopes et peuvent se lier à plusieurs sites différents d'un même immunogène ou antigène complexe, ce qui leur confère une excellente capacité globale de liaison. Les AcP ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les révélations de Western Blot, les procédures immunohistochimiques et d'immunoprécipitation, en immunofluoromicroscopie et en immunoélectromicroscopie.

Les antisérums sont généralement produits par injection à un animal de l'immunogène (antigène) cible, souvent combiné à un adjuvant qui stimule la réponse immunitaire. La réponse immunitaire peut par la suite être amplifiée par des injections de rappel d'antigène avec ou sans adjuvant. Des échantillons de sang de l'animal sont prélevés pour évaluer la réponse immunitaire et le niveau de production d'anticorps. Lorsque le titre est suffisamment élevé, l'antisérum est préparé à partir d'une prise de sang suivie de l'isolement du sérum.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, Remplacer (choix de l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps, Réduire (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile).

L'espèce qui sera utilisée pour la production d'AcP est choisie avec soin. Nous prenons en compte les facteurs suivants 1) la quantité nécessaire d'anticorps ou d'antisérum (choix d'animaux de plus grandes tailles pour un besoin correspondant à de grandes quantités d'anticorps); 2) la relation phylogénétique entre l'espèce d'où provient l'antigène protéique et l'espèce utilisée pour produire l'anticorps; 3) la fonction effectrice des AcP provenant de l'espèce productrice d'anticorps; et 4) l'utilisation prévue des anticorps.

Le lapin est l'animal le plus communément utilisé pour la production d'AcP parce qu'il est facile à manipuler et que, pour la plupart des applications, il produit des volumes suffisants d'antisérum à titre élevé et à forte affinité. Il permet ainsi de Réduire le nombre d'animaux engagés dans chaque protocole à 1 ou 2 individus.

En se basant sur le nombre moyen de protocoles et d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 50 protocoles, représentant 100 lapins.

La période minimum d'immunisation est de 63 jours.

Dans la production d'AcP, la priorité principale est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. Un certificat d'innocuité est fourni par le client stipulant que l'antigène n'est pas toxique et ne présente pas de risque pour les utilisateurs ainsi que pour la santé des animaux. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine de 21 jours et qu'il ait satisfait à cette période. Cette période permettra également à l'animal de s'habituer à son nouvel environnement.

Les animaux sont surveillés tous les jours ouvrés et plus particulièrement durant les premières heures juste après l'immunisation. Cette observation quotidienne permet une détection précoce de tout signe d'inconfort ou de douleur et permet ainsi une intervention adaptée au plus tôt en accord avec les points limites définis avec notre vétérinaire. Les lapins sont hébergés en cage individuelle adaptée, les portoirs sont situés en vis à vis afin de maintenir leur sociabilisation. Des objets d'enrichissement (morceaux de bois adaptés à ronger, plateforme, biscottes, snack ball,...) sont placés dans les cages afin de stimuler l'activité des animaux.

14510 Comprendre comment le cerveau encode, consolide, stocke et restitue nos souvenirs est fondamental en Neurosciences. Ces fonctions reposent sur des circuits neuronaux précis et complexes reliant de grands ensembles de neurones. Lors du développement, les axones et les dendrites acquièrent très tôt des caractéristiques moléculaires et anatomiques distinctes. Alors que les axones sont envoyés vers leurs cibles spécifiques, la formation d'une arborisation dendritique de plus en plus complexe autour du neurone permet la croissance des épines dendritiques qui établissent des contacts grâce à des jonctions intercellulaires spécialisés : les synapses.

Il est maintenant connu que les protéines de la Polarité Cellulaire et Planaire (PCP) contrôlent la division asymétrique des cellules, le guidage axonal et la formation des synapses. Vangl2 est la protéine majeure de la PCP exprimée dans le cerveau des mammifères. Nous avons récemment constaté que cette protéine s'accumule dans la région de l'hippocampe, une structure très importante pour l'apprentissage et la mémoire.

Nous soumettons ici l'hypothèse que Vangl2 contrôle le développement des circuits de neurones de l'hippocampe notamment du Gyrus denté (DG) et du CA3 au cours de la formation du cerveau, et participe à l'âge adulte au remodelage synaptique à la base des processus d'apprentissage et de mémorisation.

Dans ce projet, nous étudierons si l'impact de la mutation Vangl2 sur l'altération du remodelage synaptique entre le DG et le CA3 peut être compensé à l'âge adulte par une exposition à un environnement enrichi.

Règle des 3R.

Remplacer Ce projet s'intègre dans un projet plus global combinant différents travaux de recherche complémentaires allant de l'étude biochimique ou bio moléculaire au comportement. Beaucoup d'études « in-vitro » sont donc effectuées sur des cellules en culture en amont de l'utilisation de lignées d'animaux pour limiter au maximum leur utilisation.

Réduire Pour ce projet nous utiliserons deux lignées de souris transgéniques différentes et nous avons estimé le nombre total d'animaux nécessaire à ce projet à 154 souris sur 5 ans. Afin d'utiliser le nombre minimal d'animaux mais de garantir la validité scientifique et statistique des résultats, nous avons évalué par une étude empirique qu'un nombre minimum de 6 animaux par groupe est nécessaire pour notre étude.

Raffiner Pour supprimer l'angoisse, la détresse ou la douleur subie par les animaux au cours de l'expérience, les animaux sont élevés en cage enrichie avec un nid végétal, surveillés régulièrement et des points limites suffisamment précoces ont été mis en place. De plus concernant la procédure de chirurgie, une analgésie préalable, le mode d'anesthésie (gazeuse + locale) ainsi que le suivi-post opératoire permettent de réduire au minimum l'inconfort et la douleur de l'animal.

14511 Dans le cadre de cette demande, nous souhaitons aborder les conséquences physiologiques de la perte de fonctions de gènes *in vivo* appelés snoARN, en utilisant la souris comme modèle d'étude (souris knockout, KO). Ces gènes, retrouvés uniquement chez les mammifères placentaires, sont exprimés uniquement dans le cerveau, avec une expression marquée dans les neurones. A ce jour, il n'existe pas de système cellulaire pertinent permettant d'aborder leurs fonctions. Plus précisément, nous souhaitons tester si l'invalidation de ces gènes que nous étudions influence, positivement ou négativement, le comportement alimentaire et la réponse métabolique des souris KO, notamment lorsqu'elles doivent faire face à un régime riche en gras. Les expériences proposées sont classiques et maîtrisées par les équipes de recherche participant à ce projet. Elles

seront réalisées sur des souris mâles (fond C57Bl/6J) classiquement utilisés pour ce type d'expérimentation. Cette étude nécessitera 720 animaux pendant une période de 5 ans. Cette estimation correspond à la fourchette haute et prend en compte l'ensemble des expériences envisagées. Il va sans dire que nous limiterons le nombre des animaux utilisés en fonction des résultats et de leur reproductibilité. Compte tenu de la variabilité attendue de la réponse mesurée, des cohortes de 10 animaux sont nécessaires pour obtenir un résultat statistiquement pertinent. Les souris devenant obèses après quelques semaines de régime gras, elles seront hébergées par cages de 3 individus au lieu de 4 ou 5. Les animaux seront observés 3 fois par semaine et pesés 2 fois par semaine afin de repérer des anomalies, notamment en termes de comportement général, de prise de poids ou d'apparence. Les souffrances qui pourraient survenir lors de ce projet pourraient provenir de l'éventuelle agressivité des mâles entre eux. En cas de blessures, les animaux seront séparés et leurs blessures traitées à la Bétadine pour favoriser une cicatrisation propre voire euthanasiés sur avis du responsable du « Bien-être animal » de la zootechnie.

14512 L'obésité est un problème de santé public majeur à l'échelle mondiale. Actuellement, plus de 600 millions de personnes sont obèses, et ce nombre ne cesse de croître. Ces patients ont un risque accru de développer des complications chroniques telles que le diabète de type 2, des maladies cardiovasculaires et plusieurs types de cancer. Traiter l'obésité réduirait considérablement l'incidence de toutes les maladies qui y sont associées. Malheureusement, les traitements actuels ne sont pas suffisamment efficaces, et les régimes ou les exercices physiques n'entraînent souvent qu'une perte de poids temporaire. De nouvelles options pharmacologiques sont donc nécessaires de toute urgence pour lutter contre cette maladie.

L'un des traitements les plus prometteurs contre l'obésité et le diabète de type 2 consiste à utiliser des médicaments capables de mimer l'action d'une hormone produite par l'intestin et favorisant la sécrétion d'insuline. Bien qu'efficaces pour aider à contrôler le diabète, ils ne réduisent pas de manière satisfaisante le poids corporel des patients obèses et ne les protègent donc pas des complications chroniques. Ce traitement à lui seul ne produit pas d'impact transformateur sur la menace mondiale que représentent l'obésité et le diabète de type 2 pour la santé. Par ailleurs, d'autres médicaments bloquant l'activité d'un autre récepteur au niveau des organes périphériques, pourraient permettre une perte de poids importante dans les modèles d'obésité chez la souris, sans induire d'effets secondaires apparents.

Ainsi, nous pensons que la combinaison pharmacologique de ces deux voies thérapeutiques pourrait représenter une stratégie plus efficace pour traiter l'obésité et les complications métaboliques associées, et voudrions tester cette hypothèse en utilisant un modèle d'obésité chez la souris. Au total, nous utiliserons un maximum de 576 souris sur 5 ans. La souris est le modèle de choix pour notre projet car elle permet d'étudier des individus génétiquement modifiés dont la physiologie générale est suffisamment proche de celle de l'homme. Ce projet va donc nous permettre d'obtenir des informations médicalement pertinentes. De plus, les mécanismes biologiques étudiés (poids corporel et métabolisme du glucose) impliquent un processus de communication entre le cerveau et le reste du corps. Un tel processus de communication est crucial pour la régulation de l'appétit, du taux de sucre dans le sang et le stockage des graisses. Par conséquent, il est absolument nécessaire d'étudier un organisme vivant entier et aucune méthode *in vitro* ou *in silico* ne peut remplacer nos modèles murins. Conformément au principe des 3R, nous avons optimisé les protocoles afin de minimiser le nombre de souris utilisées des tests statistiques de puissance ont été utilisés pour prévoir avec précision le nombre d'animaux nécessaires afin d'obtenir des résultats statistiquement fiables. Enfin, une attention particulière sera accordée au bien-être des animaux. Un suivi précis du poids et de la consommation de nourriture de chaque souris nécessite l'isolement de l'animal. Les souris seront hébergées dans des cages individuelles dans une pièce réservée dans laquelle la température, l'humidité et la lumière y sont régulés. Le manque d'interaction sociale au sein de la cage sera compensé par un enrichissement des cages. Les cages qui seront utilisées sont transparentes et elles seront placées les unes à côté des autres de manière à ce que chaque animal puisse avoir un contact visuel avec d'autres animaux. Avant

chaque expérience, les animaux seront manipulés fréquemment afin de les habituer aux expérimentateurs, réduisant ainsi leur stress.

14513 La radiothérapie est un outil incontournable dans la prise en charge thérapeutique des cancers. La principale difficulté dans la mise en place des protocoles de radiothérapie est de cibler la tumeur tout en épargnant au maximum les tissus sains environnants. Ces tissus sains irradiés sont responsables du développement de séquelles aiguës (dans les semaines suivant la radiothérapie) et/ou tardives (des mois voire des années après la radiothérapie).

Le cancer pulmonaire est un des cancers les plus diagnostiqués et est associé à un taux de mortalité qui reste encore aujourd'hui très élevé. Les progrès dans la prise en charge thérapeutique de ce type de cancer sont néanmoins importants et les patients peuvent développer des effets secondaires impactant fortement leur qualité de vie, de type pneumopathie radique ou fibrose pulmonaire radio-induite.

Un des objectifs du laboratoire est de comprendre les mécanismes du développement des effets secondaires des expositions médicales aux rayonnements ionisants. Dans ce cadre, des modèles précliniques d'irradiation pulmonaire chez la souris ont été mis en place au laboratoire. Le premier modèle utilisé est une exposition du thorax entier aux rayonnements ionisants, qui génère de la fibrose sur l'ensemble du parenchyme pulmonaire et mime les irradiations thoraciques en champ large. Le second modèle est une irradiation ciblant un petit volume pulmonaire et mimant le traitement des tumeurs broncho-pulmonaires précoces par l'utilisation de la radiothérapie en conditions stéréotaxiques.

Au cours des précédentes études au laboratoire, nous avons mis en évidence des modifications importantes du nombre de cellules club (qui sont des cellules de l'épithélium bronchiolique) en réponse à l'irradiation. Nous souhaitons avec le présent projet explorer plus précisément l'importance de ces cellules dans le développement des lésions radiques pulmonaires. Pour appréhender le rôle de ces cellules dans différents contextes pathologiques, il existe un modèle de déplétion transitoire des cellules club *in vivo* par injection intrapéritonéale unique de naphthalène. La déplétion se fait en 48 à 72h et l'épithélium bronchiolique est régénéré ensuite en 2 semaines.

Dans ce projet, l'objectif est d'exposer le système pulmonaire aux rayonnements ionisants (en utilisant les deux modèles cités ci-dessus) à deux moments différents au moment de la déplétion effective des cellules club et au moment où l'épithélium bronchiolique est recolonisé. Ce projet se déroulera sur une durée totale de 12 mois.

Les modèles d'irradiation sont reproductibles et maîtrisés depuis plusieurs années par le laboratoire. Le recul acquis permettra de mettre en évidence des différences au niveau de la sévérité des lésions induites en fonction de la présence ou non de cellules club au sein de l'épithélium bronchiolique.

Le nombre total de souris utilisées pour ce projet sera de 182. La réponse globale du tissu pulmonaire aux rayonnements ionisants ne peut être appréhendée qu'*in vivo*, au sein d'un système biologique intégré. Les modèles utilisés sont connus et le nombre d'animaux pour chaque test optimisé pour obtenir des résultats statistiquement robustes tout en évitant d'utiliser un nombre trop important d'animaux. Enfin, les animaux sont suivis quotidiennement (plus si nécessaire) et des décisions d'euthanasie anticipée sont prises en cas de souffrance et d'inconfort sévère des animaux. Les conditions de soins et d'hébergement des animaux sont adaptées aux procédures réalisées afin de limiter au minimum la souffrance animale (mise en place de grilles de score, suivi des animaux, anesthésie pour les irradiations, hébergement en groupe avec enrichissement).

14514 L'extrême prématurité (naissance avant 28 semaines d'aménorrhée (SA)) est un véritable problème de santé publique, notamment dans le monde occidental où elle est la première cause de morbi-mortalité néonatale. Malgré les progrès indéniables dans la prise en charge de ces nouveau-nés dans les vingt dernières années, le risque de séquelles neurologiques et pulmonaires reste élevé, de façon inversement proportionnelle au terme de naissance. Plusieurs équipes dans le monde se sont intéressées à mettre au point des systèmes de développement fœtal extra-utérin, en arguant

de la possibilité de retombées thérapeutiques (alternative à la réanimation néonatale conventionnelle pour la période 22-26 SA). L'objectif de notre équipe à moyen terme est de réaliser un système de développement fœtal extra-utérin qui sera mis au point chez le mouton afin de créer un modèle physiopathologique unique permettant d'analyser finement le développement fœtal en fonction de l'environnement et de ses variations (métaboliques, hormonales, hémodynamiques, inflammatoires...).

La première partie de notre projet vise à caractériser l'impact de la prématurité sur le développement des tissus, en particulier pulmonaire, et le système nerveux central. Cette analyse sera menée dans l'espèce ovine, durera 6 mois et permettra de valider la pertinence (expression, localisation cellulaire) de marqueurs de développement identifiés dans l'espèce humaine. De par ses caractéristiques de corpulence et de développement prénatal semblables à celles de l'espèce humaine, le mouton est un modèle animal reconnu pour mener cette recherche préclinique, essentielle pour mesurer le bénéfice de nos avancées technologiques en terme d'améliorations de la santé des nouveau-nés. Ce projet ne peut pas être mené par des méthodes substitutives car la validation des marqueurs nécessite des organes entiers et développés *in vivo*.

Après synchronisation du cycle sexuel et accouplement, les brebis gravides seront suivies par échographie et seules les femelles porteuses de deux fœtus seront incluses dans le protocole expérimental. Sur ces brebis gravides, des césariennes seront réalisées à 100 jours de gestation et à terme (140 jours) afin d'obtenir des agneaux à ces deux stades. La césarienne est une étape de chirurgie maîtrisée et indispensable pour avoir une évaluation exacte du terme de naissance. Les deux stades de développement sont comparables aux stades de développement des nouveau-nés humains à 24 et 41 semaines d'aménorrhée (extrême prématuré et à terme). Les agneaux seront immédiatement euthanasiés et leurs tissus (poumons, cerveau, foie, intestin, rate, tissu adipeux, peau) seront prélevés pour mener les analyses d'immunolocalisation et d'expression moléculaire de marqueurs du développement. Cette étude préliminaire sera réalisée à partir de 12 brebis adultes et gravides, effectif nécessaire pour obtenir 12 fœtus à 100 jours et 12 fœtus à 140 jours de gestation. Le nombre de fœtus est suffisant pour réaliser une analyse dynamique de l'expression des marqueurs de développement tout en intégrant l'effet sexe dans l'interprétation des données (agneaux mâles et femelles). La règle des 3R sera respectée ainsi (remplacement) en nous appuyant sur les données validées dans l'espèce humaine pour analyser les marqueurs moléculaires; (raffinement) par le fait que les brebis seront hébergées en groupe avant la chirurgie et aussi vite que leur récupération post-opératoire le permettra, par la prise en charge d'éventuelles complications infectieuses ainsi multimodale de la douleur, qui comprend l'administration préopératoire d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (meloxicam, scopolamine, métamizole) associée à la réalisation d'une anesthésie locale (procaïne) et à une sédation (xylazine), prévention de la douleur qui sera poursuivie pendant la période postopératoire à l'aide d'AINS (meloxicam) pendant une période minimale de 6 jours (réduction) en fixant l'effectif des fœtus au minimum nécessaire pour tirer les conclusions biologiques pertinentes afin de limiter le nombre de brebis impliquées dans ce protocole en sélectionnant des brebis porteuses de deux fœtus qui, à l'issue de l'intervention, seront réveillées avec un suivi clinique afin d'assurer leur récupération post-opératoire, et leur remplacement dans le circuit de l'élevage ovin afin de poursuivre leur carrière.

14515 La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) est une maladie pulmonaire caractérisée par une prolifération progressive des fibroblastes et un déclin progressif de la fonction pulmonaire, conduisant à une insuffisance respiratoire. Près de 110 000 personnes souffrent de FPI en Europe et 35 000 nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année. En France, il y aurait un minimum de 9000 personnes touchées et un minimum de 4400 nouveaux cas chaque année. Sa cause reste inconnue à ce jour. Les mécanismes physiopathologiques conduisant à la FPI sont encore peu connus. Ce projet vise à identifier, *in vivo* dans un modèle murin, des acteurs moléculaires favorisant le développement de la fibrose pulmonaire idiopathique. En particulier, nous étudierons le rôle d'un facteur d'échange des protéines Ras dans la FPI et ses conséquences fonctionnelles sur le remodelage pulmonaire et cardiaque (fibrose, fonction cardiaque). Par des outils moléculaires et pharmacologiques originaux, nous avons montré, dans un modèle cellulaire, que la délétion

génétique de ce facteur d'échange ou de son inhibition pharmacologique limite le stress oxydant, la prolifération des fibroblastes et des marqueurs de fibrose. Les objectifs de ce projet sont de compléter et d'étendre ces résultats *in vivo* par l'étude de l'implication de ce facteur d'échange dans un modèle de FPI chez la souris comparable à l'homme. Il s'agit d'un projet d'innovation thérapeutique car cette étude permettra de valider ce facteur d'échange comme cible pharmacologique prometteuse pour le traitement de la FPI.

Dans le cadre de ce projet, l'application de la règle des 3Rs se décline comme suit Remplacement Seul un système intégré, l'animal, peut reproduire les différentes composantes des pathologies humaines mimées. En effet, la fibrose pulmonaire idiopathique est la conséquence d'un processus de remodelage pulmonaire induit par de multiples systèmes (immunitaires, endocriniens, ...) dont les mécanismes ne peuvent être étudiés que chez l'animal. De plus l'utilisation d'un mammifère est un gage d'une meilleure transposition vers la clinique dont le besoin de nouveaux traitements est urgent. D'autre part, les outils génétiques dont nous disposons ne sont présents que chez la souris. Ainsi, les expériences seront réalisées chez la souris en l'absence d'alternative possible.

Réduction Lors des études, chaque animal est utilisé pour mesurer plusieurs caractéristiques (physiologiques, anatomiques, histologiques, biochimiques et moléculaires) du développement de la pathologie lorsque les techniques sont compatibles. Ainsi, le nombre d'animaux est réduit au nombre strictement nécessaire pour évaluer le critère de dysfonction pulmonaire et cardiaque mais chaque animal est aussi utilisé pour des mesures complémentaires de caractérisation de la pathologie. Cette démarche permet d'une part de limiter le nombre des animaux à celui nécessaire pour répondre à la question scientifique et d'autre part d'éclairer sur les mécanismes et permettre de générer de nouvelles hypothèses grâce aux corrélations qui peuvent être faites entre les différentes mesures. Par ailleurs, ce projet est original l'implication de la protéine d'intérêt n'a jusqu'à présent jamais été testée dans cette pathologie. Compte-tenu de la variabilité des mesures et des différents groupes utilisés, une quarantaine de souris sera utilisée par groupe. Il y aura deux groupes d'animaux sauvages traités ou non (contrôle traité au PBS) à la bléomycine et deux autres groupes d'animaux portant une délétion génique du facteur d'échange (animaux knock). Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet sera estimé à 160.

Raffinement Au cours des expérimentations, pour éviter anxiété ou douleur, des anesthésiques et des analgésiques sont utilisés lorsque c'est nécessaire. Il est à noter cependant, que, le développement de l'atteinte pulmonaire n'est pas douloureux. Un suivi quotidien des animaux est mis en place et leur état de santé apparent est observé (comportement, état du pelage, isolement). De plus, le suivi régulier de la fonction cardiaque par imagerie permet d'estimer de manière objective et précoce (avant l'apparition de signes cliniques) les animaux nécessitant une attention particulière. Toute intervention jugée nécessaire (soins, euthanasie) est réalisée par un personnel compétent. Les conditions d'hébergement correspondent aux standards réglementaires et les animaux organisés en groupes sociaux ont un accès ad libitum à l'eau et à la nourriture.

Les points limites décidés pour ce programme sont une perte de poids excessive, une prostration, l'absence de toilette, la déshydratation.

14516 La maladie d'Alzheimer est un problème majeur de santé publique. Près de 225000 nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année en France et d'ici 2020, il y aura environ 1,3 millions de personnes touchées par cette pathologie. Les malades présentent dans leur cerveau deux types de lésions caractéristiques qui détruisent les neurones. Ils souffrent principalement de troubles de la mémoire et du comportement. Les médicaments actuels ne permettent pas de guérir la maladie. Il est donc indispensable de rechercher des traitements innovants pour ralentir ou stopper la mort des neurones et ainsi améliorer les symptômes. Plusieurs stratégies thérapeutiques utilisées actuellement testent les effets directs de substances diverses sur des mécanismes clés de la maladie. D'autres stratégies plus physiologiques sont attrayantes car elles permettent de stimuler la production endogène de molécules aux propriétés protectrices et anti-amnésiantes. L'objectif principal du projet s'inscrit dans cette dernière perspective. Nous évaluerons les effets d'une molécule connue et testée dans d'autres affections chez l'Homme, sur la mémoire, la neuropathologie et les concentrations cérébrales de stéroïdes dans un modèle de rat de la maladie

d'Alzheimer. Des rats génétiquement modifiés sans phénotype dommageable seront utilisés pour mieux comprendre les mécanismes mis en jeu dans les effets de la molécule.

La règle des 3 R a été prise en compte comme suit. Remplacement il est impossible de remplacer notre modèle animal de la maladie d'Alzheimer par un modèle cellulaire car ce dernier ne permet pas de rendre compte des différents aspects d'une maladie complexe, ni des effets de la molécule étudiée sur les symptômes et le comportement associé à la maladie.

Néanmoins, nous avons réduit au maximum le nombre d'animaux prévus, et les procédures expérimentales seront raffinées comme indiqué ci-dessous.

Réduction nous prévoyons d'utiliser au maximum 150 rats pour les 4 ans à venir, un nombre nécessaire et suffisant pour réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés pour ne pas compromettre la validité des expériences et obtenir des résultats statistiquement significatifs.

Raffinement Les animaux seront hébergés en groupes sociaux dans des cages enrichies et dans des conditions de température et d'humidité contrôlées. Ils auront libre accès à la boisson et la nourriture. Ils seront régulièrement pesés et leur état général de santé soigneusement surveillé. Toute douleur ou souffrance sera réduite au minimum en contrôlant toutes les procédures expérimentales. Dans le cas où une souffrance d'un animal est jugée trop importante selon une grille d'évaluation précise et en accord avec le responsable, la procédure sera arrêtée pour lui dans le respect du bien-être animal.

Nous nous attendons à ce que le traitement utilisé diminue les signes pathologiques et améliore la mémoire dans notre modèle animal mimant la pathologie humaine.

14517 Dans un futur proche, le nombre et la durée des missions spatiales habitées devraient inexorablement augmenter. En effet, les agences spatiales ont comme projet d'envoyer à plus ou moins long terme des astronautes sur la Lune, Mars ainsi que sur des astéroïdes; tandis que des compagnies privées souhaitent développer une exploitation commerciale de l'espace en proposant des services comme le tourisme spatial et les taxis de l'espace. Dans ce contexte, il est nécessaire de mieux connaître les effets de la microgravité sur la physiologie humaine. Notre équipe de recherche a récemment démontré chez l'homme et l'animal que l'hepcidine, une hormone hépatique essentielle à la régulation du métabolisme du fer, était davantage synthétisée en réponse à la microgravité. Cette augmentation est à l'origine d'une redistribution du fer dans l'organisme en faveur d'une augmentation du stockage du fer, notamment dans la rate, associée à une diminution de la biodisponibilité en fer. La réduction de la biodisponibilité en fer participe à réduire la synthèse de globules rouges et donc favorise une anémie, alors que le stockage de fer au sein des organes pourrait promouvoir l'atrophie musculaire et l'ostéoporose. Dans ce contexte, notre projet a pour ambition de tester une contremesure innovante pour lutter contre ces altérations en testant le potentiel intérêt d'une supplémentation en testostérone. Cette dernière est en effet connue pour inhiber la synthèse d'hepcidine et favoriser l'érythropoïèse dans l'organisme. Par ailleurs, elle est actuellement testée chez l'homme par les agences spatiales américaines (NASA) et européenne (ESA) pour lutter contre d'autres troubles physiologiques comme la perte de masse et de force musculaire. Pour répondre à notre objectif, nous souhaitons déterminer chez des rats Wistar les effets et les mécanismes par lesquels la testostérone pourrait prévenir la réduction de la biodisponibilité et le stockage tissulaire du fer en réponse à la microgravité, avec une attention toute particulière sur la régulation de l'hepcidine.

Ce projet de recherche a été pensé en respectant au mieux la règle des 3R. Ainsi, les animaux seront hébergés dans une structure agréée qui tient compte de l'éthique animal et assure le suivi quotidien. Par l'intermédiaire de ce protocole expérimental, nous souhaitons explorer les interactions physiologiques entre le muscle squelettique et le foie soulignant la nécessité de s'appuyer sur un modèle animal (Remplacement). Toutefois, le nombre d'animaux nécessaire pour l'expérimentation (4 groupes de 12 individus) a été déterminé à partir d'une approche statistique (Sample Size test) afin de limiter le nombre d'animaux utilisés dans cette expérimentation (Réduction). L'hébergement se fait dans des cages individuelles, accolées et transparentes, pour réduire la sensation d'isolement. Les cages sont munies de jouets compatibles avec le modèle afin

de minimiser le stress induit par le modèle expérimental. Le raffinement est complété par une double surveillance journalière des animaux pour s'assurer que les conditions de bien-être des animaux sont optimales (Raffinement).

14518 Le développement des capacités cognitives, aussi bien spatiales que sociales, semble avoir joué un rôle majeur dans l'évolution des primates en général et des humains en particulier. Ces derniers se démarquent en effet par la sophistication des concepts spatiaux et des outils qu'ils manipulent, leurs capacités langagières et leur hyper-sociabilité. Identifier les réseaux corticaux qui sous-tendent cognition spatiale et cognition sociale, savoir comment ils s'articulent et quelles sont leurs particularités chez l'homme par rapport à d'autres primates, sont donc des enjeux majeurs en Neurosciences Intégratives. Ce projet de recherche vise à caractériser ces réseaux corticaux chez le singe macaque rhésus, d'une manière non invasive qui sera aussi implémentée chez l'Homme pour des études comparatives.

Pour cela, nous proposons une approche multimodale en imagerie par résonance magnétique (IRM), qui implique notamment de l'IRM fonctionnelle de stimulation, de l'IRM fonctionnelle de repos, de l'IRM anatomique, de l'IRM de diffusion et de la cartographie des cartes de myéline. Le projet sera conduit sur un plateau technique doté d'une animalerie primate aux normes en vigueur et d'une IRM dédiée à la recherche et agréée pour recevoir à la fois des sujets humains et des singes macaques. Six macaques rhésus femelles adultes participeront aux différents protocoles d'imagerie, dont certains seront réalisés sous légère sédation. L'unique aspect invasif du projet consiste en la pose chirurgicale d'une pièce de fixation de tête sur les animaux préalablement anesthésiés et analgésiés. Cet implant sera ôté en fin de projet dans les mêmes conditions. Ce projet fait partie d'une stratégie scientifique plus large, puisque 3 centres de recherche nationaux se proposent de l'implémenter en parallèle, chez le singe macaque rhésus mais aussi chez l'Homme, afin d'augmenter la taille des échantillons et ainsi d'ouvrir la voie à des études comparatives plus robustes. Le projet est prévu pour durer 5 ans, et il a déjà reçu un soutien financier de l'Agence Nationale de la Recherche.

Les connaissances que ce projet dégageront doivent permettre de mieux comprendre comment cognition spatiale et cognition sociales sont implémentées chez le primate, et en quoi cette implémentation diffère entre l'Homme et le singe macaque. Ces connaissances, acquises de manière non-invasive, seront aussi précieuses pour raffiner et réduire les besoins en approches invasives qui visent un savoir plus fin sur le fonctionnement intime de ces réseaux corticaux, et elles faciliteront la généralisation de ce savoir à l'humain.

Le positionnement de ce projet par rapport à la règle des 3 Rs peut être décrit ainsi :

Remplacement : les processus cognitifs que nous cherchons à comprendre s'expriment, par essence, dans un organisme entier en interaction avec son environnement. Le choix du modèle animal est dicté par la volonté d'effectuer une étude comparative de ces réseaux entre primates humains et non-humains pour (1) identifier les spécificités humaines, (2) caractériser les domaines de validité du modèle animal.

Réduction : les études en imagerie fonctionnelle chez le singe macaque reposent généralement sur des échantillons faibles (2 à 6 individus). L'approche multicentrique que nous proposons permettra d'atteindre un échantillon de 15 individus, ouvrant la voie à des traitements statistiques plus robustes, et donc à un plus grand pouvoir de généralisation des résultats obtenus.

Raffinement : tout stress ou souffrance ayant un effet négatif sur les processus cognitifs étudiés, il convient de veiller à les diminuer au maximum. Cela passera notamment par l'utilisation d'analgésie en post-opératoire, une surveillance continue des animaux pour détecter tout signe de détresse et un conditionnement comportemental très graduel.

14519 Le projet a pour objectif l'évaluation de traitements mini-invasifs sur un modèle de tumeur VX2 chez le lapin. Différentes études seront réalisées selon le type de traitement testé et selon les objectifs scientifiques (performances, tolérance, efficacité). Notre équipe travaille dans le domaine de l'oncologie et des thérapies innovantes dites mini-invasives des tumeurs. Ces thérapies peuvent

être des traitements chirurgicaux par des techniques percutanées, des traitements de radiologie interventionnelle avec guidage en temps réel par radioscopie (embolisation, ablation) ou des traitements pharmacologiques par des thérapies ciblées.

L'utilisation de cellules tumorales VX2 chez le lapin comme modèle de tumeur hépatique a été développée dans les années 50. Le modèle présente l'avantage d'être reproductible, facilement implantable, à croissance rapide et transplantable dans de nombreux organes. De plus, contrairement aux rongeurs, la taille du lapin permet l'utilisation des mêmes appareillages que chez l'homme. Le VX2 est aujourd'hui le modèle tumoral préclinique le plus couramment utilisé en radiologie interventionnelle.

Le projet comprend l'implantation des cellules tumorales VX2 dans le foie de l'animal, le contrôle du développement des tumeurs et les procédures d'interventions classiquement utilisées pour leur traitement. Un total de 100 lapins sera utilisé pour les 2 années de la demande d'autorisation de projet.

Principe des 3R

* Remplacement La mise au point, l'évaluation et l'optimisation des traitements anticancéreux nécessitent l'utilisation d'un système *in vivo* reproduisant les conditions pratiques cliniques conditions d'anesthésie, anatomie et physiologie, matériel utilisé, biologie tumorale pour évaluer la réponse au traitement. En parallèle, des méthodes alternatives de culture de cellules VX2 seront utilisées pour des tests de prolifération/viabilité sur de plus larges gammes d'agents thérapeutiques (screening) ou pour évaluer les mécanismes moléculaires des traitements ensuite testés *in vivo* (microarray, RT-PCR...).

* Réduction Le nombre d'animaux utilisés pour chaque étude est estimé d'après l'expérience de notre établissement sur le nombre d'individus nécessaire pour réaliser une analyse statistique pertinente, classiquement compris entre 4 et 10 animaux par groupe d'étude.

* Raffinement Un protocole de suivi des animaux et de prise en charge de la douleur, avec évaluation quantitative des paramètres de suivi pour définir le point limite, sont utilisés afin de réduire au maximum la douleur animale.

14520 Ce projet a pour but d'explorer les modifications de la sensibilité douloureuse associées à la maladie autistique et au retard mental héréditaire. Le syndrome X fragile (FXS) est la cause la plus fréquente (1/4 000 hommes et 1/7 000 femmes) de l'autisme avec retard mental héréditaire, et il est dû à une mutation sur le chromosome X qui entraîne l'absence de la protéine FMRP (Fragile X Mental Retardation Protein), qui contrôle de nombreuses fonctions dont la quantité et la localisation de nombreuses protéines cellulaires des neurones.

Très récemment, une protéine intracellulaire, la phosphodiesterase 2A (PDE2A), a été identifiée comme une cible majeure de la FMRP, l'absence de la FMRP augmentant l'activité de la PDE2A. Les défauts morphologiques des neurones du cerveau et les défauts d'interactions sociales caractéristiques de l'autisme et du FXS ont été associés à cette activité accrue de la PDE2A dans des souris "malades" dont le gène de la FMRP (*Fmr1*) a été invalidé (*Fmr1* knock-out (KO)).

Par ailleurs, la PDE2A et les mécanismes intracellulaires qui lui sont associés sont connus pour pouvoir participer au message nerveux douloureux. Notre équipe s'intéressant aux mécanismes moléculaires de la détection de la douleur par les neurones sensoriels périphériques (peau, muscles, viscères.), puis aux mécanismes de la transmission du message douloureux dans le système nerveux central (moelle épinière et cerveau), nous proposons d'explorer les modifications de la sensibilité douloureuse cutanée chez des souris dans lesquelles le gène de la protéine FMRP (*Fmr1*-KO) et/ou le gène de la PDE2A (*Pde2a*-KO) sont non fonctionnels. Ce projet combinera des expériences de comportement et de pharmacologie *in vivo* pour identifier les modifications de la sensibilité douloureuse associées à l'autisme du FXS dans différentes modalités douloureuses, et testera si l'injection d'inhibiteur de la PDE2A et d'autres signaux intracellulaires pourrait restaurer une sensibilité normale. Ces expériences seront complétées par de l'histologie pour visualiser les protéines FMRP et PDE2A dans les neurones sensoriels et les neurones de la moelle épinière.

Les résultats obtenus permettront de mieux comprendre les mécanismes neuronaux moléculaires de la douleur impliquant la protéine FMRP, la PDE2A et les mécanismes intracellulaires qui lui sont associés, ainsi que de mieux comprendre les symptômes associés au FXS et proposer la PDE2A comme nouvelle cible thérapeutique.

L'objectif de Réduction a été pris en compte car le nombre total de souris (3840) correspond au nombre maximal nécessaire à l'obtention de résultats significatifs (15 souris/condition, calculé par le logiciel GPower). Il sera réduit chaque fois que possible, et toute expérience rendue inutile par des résultats obtenus par nous ou d'autres groupes (veille bibliographique mondiale permanente) ne sera pas conduite. Dans le cadre de l'objectif de Raffinement, la longue expérience de notre groupe dans les études des mécanismes de la douleur chez l'animal nous permet de proposer des tests comportementaux complémentaires mettant en jeu différentes modalités douloureuses (thermique, chimique ou mécanique, aiguë ou inflammatoire, réflexe spinal ou comportement intégré supraspinal ...) ou motrices (motricité intégrée ou force musculaire) avec une sévérité légère à modérée. Le maximum d'expériences préliminaires a été réalisé sur des lignées cellulaires, puis sur des neurones de rongeurs (rats, souris) en culture, mais aucune méthode alternative ne permet de satisfaire l'objectif de Remplacement à notre connaissance. Ces études précliniques chez l'animal permettent seules l'étude de la réalité physiologique dans un contexte intégré, et restent nécessaires à la poursuite d'études cliniques ultérieures. Dans le cadre de la prise en compte de leur souffrance, les animaux seront habitués aux tests préalablement afin de réduire leur stress. Nous ne pouvons néanmoins pas envisager l'emploi d'analgésique ou d'anesthésique dans nos procédures qui ont pour objet d'étude la douleur. Grâce à un suivi quotidien de chaque animal tout au long de chaque procédure, tout animal qui présenterait des signes de paralysie, de douleur excessive permanente (vocalisations, convulsions), de comportement anormal (prostration, apathie.) ou d'une pathologie quelconque (plaie) serait euthanasié sur le champ.

14521 La fibrillation atriale est le trouble du rythme cardiaque le plus fréquent. Son origine a été localisée autour des veines pulmonaires dans l'oreillette gauche. Elle est la plupart du temps de courte durée et sans grandes conséquences cliniques. Cependant, pour les cas graves, les zones qui génèrent un rythme électrique permettant le déclenchement de la fibrillation atriale nécessitent d'être mieux localisées par des systèmes de cartographie électrique. Cependant certaines de ces zones, appelées drivers, ne sont pas obligatoirement actives dans le maintien de la FA dans sa forme persistante. Le but de notre étude est donc de cartographier les zones de drivers les plus actives par un système de cartographie haute densité au cours de la FA sous sa forme persistante et d'étudier anatomopathologiquement ces zones notamment en terme de fibrose cardiaque.

Pour ce projet nous envisageons d'utiliser 20 porcs pour obtenir suffisamment de données pour décrire de manière fiable et répétitive les origines précises de la fibrillation atriale persistante. Au cours de cette étude, les porcs se verront implanter par un abord micro-invasif un pacemaker dans l'oreillette droite. Ce pacemaker sera réglé de manière à provoquer une fibrillation atriale par stimulation électrique rapide permanente au niveau du noeud sinusal. Les animaux subiront - également par le biais de ce pacemaker - un suivi permanent de l'activité électrique cardiaque, afin de détecter l'entrée de leurs oreillettes en fibrillation persistante ce qui est le modèle pathologique que nous prévoyons d'étudier. A ce moment là (habituellement entre 21 et 42 jours), les animaux seront anesthésiés et les anomalies électriques seront cartographiées par voie micro-invasive également. Puis les cœurs seront prélevés afin d'étudier l'impact sur le tissu cardiaque de ce genre de maladie.

Ce genre d'étude ne peut être réalisé autrement qu'en ayant recours à un modèle animal connu et proche de l'être humain. Le porc est idéal comme modèle de l'activité électrique cardiaque du cœur de l'Homme. Nous envisageons de collecter les informations sur un groupe de 20 animaux, mais en fonction des résultats expérimentaux obtenus, ce nombre pourra être réduit si les observations sont suffisamment semblables entre animaux, à la fois dans la réalisation de la fibrillation atriale et dans les grandeurs mesurées ou décrites. Les animaux seront maintenus en anesthésie de niveau chirurgical pendant l'implantation et les mesures terminales à la suite desquelles, ils seront mis à mort sans être réveillés. La fibrillation atriale, dans ses phases précoces est fréquemment

asymptomatique chez l'homme et probablement aussi chez le porc. Au cours de son évolution, elle peut déclencher des anomalies contractiles ventriculaires à l'origine de douleurs thoraciques et de palpitations. Ici, comme nous visons des stades précoces de la maladie, si un animal présente des signes cliniques, le recueil des informations collectées par son pacemaker sera anticipé ainsi que la phase terminale de l'expérimentation.

14522 L'objectif du projet est de développer un vaccin pour protéger les volailles de la colibacillose, causée par la bactérie *Escherichia coli*, afin de diminuer la morbidité et la mortalité dans les filières avicoles et baisser l'utilisation des antibiotiques liée aux infections à *E. coli*.

Ce vaccin sera composé de vésicules de membranes externes, ou Outer Membrane Vesicles en anglais (OMV), qui sont produites à partir de l'enveloppe des bactéries et sont très étudiées par la communauté scientifique à des fins de vaccinologie.

Des études chez la souris visant à déterminer leur innocuité, leur dissémination dans l'organisme ainsi que leur mode d'action en termes d'induction de la réponse immunitaire sont requises.

Des quantités croissantes d'OMV seront administrées à des souris par instillation nasale afin de déterminer la quantité maximale d'OMV pouvant être administrée sans causer de dommages organiques. Pré- et post-inoculation, du sang sera prélevé et analysé afin de quantifier des marqueurs notamment de l'inflammation et de fonctions organiques.

L'étude de la pénétration dans les voies respiratoires des OMV rendues fluorescentes afin de faciliter leur détection sera réalisée après instillation nasale et observation des souris grâce à un système d'imagerie *in vivo*.

Nous déterminerons aussi l'effet immunostimulateur des OMV *in vivo* chez la souris. Pré- et post immunisation, du sang sera prélevé et analysé pour quantifier la réponse immunitaire induite, pour rechercher la présence d'anticorps dirigés contre les OMV et pour mesurer l'activité bactéricide des anticorps produits.

Du liquide broncho alvéolaire (LBA) et des fèces seront collectés pour y rechercher la présence d'immunoglobuline A (IgA), afin de vérifier si une immunisation croisée entre les muqueuses pulmonaire (LBA) et digestive (fèces) s'est mise en place.

Les analyses statistiques seront effectuées par ANOVA unidirectionnelle ou bidirectionnelle, puis par le post-test de Sidak ou de Dunnett, ou par le t-test de Student non apparié, à l'aide de GraphPad Prism version 7.00 pour Windows Vista (Logiciel GraphPad, San Diego, CA). Valeurs significatives considérées à $p < 0,05$.

Des OMV décorées avec des antigènes de différents agents pathogènes seront également testées dans ce modèle.

Le projet a été élaboré de façon à réduire au maximum le nombre de souris requises. Tous les moyens seront mis en oeuvre pour respecter les règles des 3R. Le bien-être de l'animal sera en permanence au centre de nos préoccupations. Les souris sont hébergées dans des cages à 21°C et 50% d'hygrométrie, en portoirs ventilés (dans des cages d'une superficie de 500cm²), avec une alternance jour/nuit de 12h/12h. La nourriture et l'eau de boisson sont fournies ad libitum. Du coton ou du sopalin sont ajoutés pour leur permettre de faire un nid. Les animaux ont une semaine d'acclimatation avant que le protocole ne débute. Les conditions d'expérimentation font l'objet d'une procédure de suivi du bien-être animal. Les animaux seront suivis quotidiennement. Tout animal présentant des signes de douleur, souffrance ou angoisse sera euthanasié. Les mesures de raffinement mises en oeuvre ici inclueront l'utilisation de procédures non invasives (imagerie *in vivo*), l'utilisation d'anesthésiant, l'application des points limites établis préalablement (les critères d'arrêt sont une baisse significative de 20% du poids corporel ou un comportement anormal (prostration, état général dégradé), et l'utilisation de procédures d'euthanasie appropriées (dislocation cervicale).

Aucune expérimentation alternative ne peut remplacer l'aspect *in vivo* de ce projet dont le but ultime est le développement un vaccin.

Au total, 1160 souris seront nécessaires, sur une période de 5 ans pour la complétion de ce projet.

14523 Les populations de cellules immunitaires jouent un rôle important dans la réponse immunitaire (suite à une infection) mais également dans différentes pathologies (maladies autoimmunes où le système immunitaire réagit contre les propres cellules de l'organisme). L'une des populations cellulaires décrites récemment, les cellules NKT17, doit encore être caractérisées afin d'obtenir des informations fondamentales concernant leur développement, et leur mode d'action lors de la mise en place de la réponse immunitaire normale ou anormale dans le contexte de l'autoimmunité. A terme, le projet de recherche permettra d'apporter de nouvelles connaissances dans le champ de la recherche fondamentale mais surtout permettra d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques, en particulier dans le traitement de maladie auto-immune comme le diabète de type I et la sclérose en plaque.

Dans le cadre de ce projet de recherche, nous mettrons en place un système de souris chimères afin de comprendre les voies de développement des cellules NKT17 et le rôle de l'environnement cellulaire dans ce développement. Pour cela, nous utiliserons des souris transgéniques ayant des modifications d'expression de molécules possiblement impliquées dans le développement et la fonction des cellules NKT17 mais ne présentant pas de phénotype altérant leur comportement et leur bien-être. Ces souris adultes (âgées de 8 semaines) seront irradiées afin d'éliminer les cellules du système immunitaire avant de recevoir par injection intra-veineuse (injection sur souris éveillée) des cellules de moelle osseuse qui se différencieront pour recréer un nouveau système immunitaire. Nous analyserons ces souris au plus tard 3 mois après le début de la procédure en étudiant la composition du nouveau système immunitaire et tout particulièrement le développement de la population NKT17 (prélèvement d'organes après euthanasie des souris chimères). Nous comparerons des groupes de souris chimères témoins (environnement cellulaire et cellules de moelle osseuse issues de souris normales) à des groupes de souris chimères dans lesquelles l'expression de certaines molécules sont absentes de l'environnement cellulaire.

Notre projet est construit en respectant la règle des 3R. Tout d'abord, le développement et la fonction des cellules du système immunitaire impliquent de nombreux acteurs cellulaires et moléculaires et se mettent en place dans des structures complexes. Il est donc impossible de remplacer totalement le modèle animal par des études *in vitro*. Nous avons réduit le nombre de souris utilisés au minimum nécessaire et suffisant pour valider scientifiquement notre étude du point de vue de l'analyse statistique. Ce projet nécessitera donc l'utilisation de 360 souris dans ce projet, sur une durée de 3 ans.

Nous veillerons au bien-être animal en réalisant une surveillance quotidienne à l'aide d'une fiche d'évaluation se basant sur différents aspects (comportement, attitude physique, poids). Nous avons ainsi défini des critères d'arrêt qui lorsqu'ils sont atteints conduiront à l'euthanasie de la souris. A l'issue de la procédure expérimentale, tous les animaux seront euthanasiés.

14524 Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde. Bon nombre de ces maladies aboutissent à un syndrome clinique connu sous le nom d'insuffisance cardiaque, qui est défini par l'incapacité du cœur à assurer la perfusion des organes. Parmi les causes de décès de patients atteints d'insuffisance cardiaque, 50% sont liés à une déficience contractile et 50% sont la conséquence de troubles du rythme cardiaque.

Les traitements pharmacologiques actuels visent à soulager les symptômes et à améliorer la qualité de vie des patients mais ne parviennent qu'à ralentir le développement de l'insuffisance cardiaque. En outre, les médicaments anti-arythmiques sont pour la plupart inefficaces voire dangereux, car ils entraînent eux-mêmes des arythmies.

Dans l'insuffisance cardiaque, on observe une augmentation chronique de l'adrénaline, une hormone de stress qui stimule la fonction cardiaque défaillante. Cette augmentation s'avère néanmoins délétère car à long terme elle favorise un remodelage pathologique du cœur.

Pour limiter cette suractivation, les bêta-bloquants sont couramment utilisés. Ces médicaments réduisent les effets de l'adrénaline sur le cœur. L'adrénaline augmente le rythme et la force de contraction en augmentant l'activité d'une protéine particulière, la protéine kinase A. Il existe deux types de protéine kinase A (PKA) dans le cœur, mais leur rôle respectif n'est pas bien connu.

L'objectif de ce projet est de comprendre le rôle de la PKA de type I dans le rythme cardiaque et la contraction afin de développer de nouvelles thérapies contre l'insuffisance cardiaque.

Pour cela, nous disposons d'une lignée de souris génétiquement modifiée dans laquelle la PKA de type I est mutée ce qui rend sa stimulation par l'adrénaline moins efficace. La fonction cardiaque de ces souris sera déterminée par échocardiographie et par électrocardiogramme en Holter (ECG). Ces techniques d'enregistrement permettront de suivre le même animal sur une durée prolongée ce qui réduit largement le nombre d'animaux utilisés. Ainsi cette étude se limitera à 48 souris afin de concilier à la fois la limite statistique raisonnable d'une étude scientifique et la règle des 3R. Les sessions d'échocardiographie réalisées sous anesthésie n'occasionnent aucune douleur chez les animaux. Pour l'enregistrement des ECG, une partie des animaux seront anesthésiés afin d'être implantés avec un petit capteur sous-cutané avec suivi quotidien post-opératoire et utilisation d'antidouleurs.

Malheureusement, les modèles animaux ne peuvent être remplacés par un modèle *in vitro* ne présentant pas l'environnement cellulaire complexe et adéquat du cœur. Les lignées de cellules cardiaques ne possèdent pas les propriétés des cellules cardiaques *in situ*. Les procédures utilisées se font dans le cadre adapté d'un hébergement agréé, respectant au maximum le bien-être des animaux, tout en limitant la souffrance par le respect des méthodes anesthésiques et analgésiques.

14525 Ce projet a pour objectif de mettre au point des techniques analytiques à partir de sérum canin positif en anticorps contre la Maladie de Carré.

Afin d'obtenir ce sérum, il est nécessaire de prélever du sang sur des chiens vaccinés contre la maladie de Carré.

Ainsi un maximum de 15 chiens, issus d'une précédente procédure expérimentale « Etude d'efficacité d'un produit vétérinaire chez le chien » de classe légère, seront inclus en fonction de leur dernier résultat sérologique.

Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, le prélèvement sanguin sera réalisé sous anesthésie, par voie intracardiaque, permettant d'obtenir un volume important de sang par une méthode terminale.

A l'issue de ce prélèvement terminal, les animaux seront euthanasiés, encore sous l'effet de l'anesthésie.

Ces interventions seront réalisées par des personnes qualifiées et les techniques utilisées limiteront la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux.

La réutilisation des chiens sur ce projet est justifiée car ils sont issus d'une procédure de classe légère et à ce jour, il n'existe pas de méthode de remplacement pour produire ce sérum canin positif en anticorps contre Maladie de Carré.

14526 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 exceptés 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 supervisée 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 d'Éthique et la Structure chargée du Bien-être des Animaux.

L'ensemble des procédures est classé en modéré. Un vaccin correctement inactivé ne provoque pas de signes cliniques. Cependant, exceptionnellement une procédure d'investigation, classée sévère, pourrait être réalisée lors d'une qualification ou validation en cas de changement dans le procédé de fabrication.

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.
- Raffinement : Les animaux sont hébergés en groupe dans des cages contenant de l'enrichissement dans des locaux appropriés et conformes aux standards réglementaires.

En cas de signes cliniques, les animaux sont euthanasiés.

14527 La sclérodémie systémique (ScS) est une maladie auto-immune orpheline complexe caractérisée par des anomalies vasculaires et inflammatoires, conduisant à une fibrose tissulaire. Les patients atteints de ScS ont un risque de décès multiplié par 3,5 par rapport à une population saine appariée. La fibrose pulmonaire et l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) constituent les deux principales causes de décès dans cette maladie.

L'apparition de l'auto-immunité chez les patients atteints de ScS est caractérisée par l'activation des cellules du système immunitaire dirigés contre les constituants normaux de l'organisme. Cette rupture de tolérance au soi peut être due à des anomalies de l'activation des lymphocytes (anomalie de la costimulation) et/ou à un déficit en lymphocytes T régulateurs (Treg), dont le rôle est précisément de maintenir cette tolérance au soi.

Malgré les progrès récents dans les connaissances physiopathologiques de la maladie, il n'existe pas de traitement permettant de traiter efficacement les complications vasculaires et la fibrose liées à la ScS.

Différentes approches visant à moduler l'équilibre de la réponse immunitaire dans la ScS ont été identifiées. L'intérêt de ces traitements dans la ScS a été conforté par des expérimentations préliminaires *in vitro*.

Nous voulons étudier *in vivo* 1) l'efficacité de deux anticorps monoclonaux dirigés contre des molécules de costimulation des lymphocytes effecteurs, 2) l'efficacité d'un agoniste des résolvines, molécules impliquées dans la résolution de l'inflammation, 3) l'effet de la restauration de la tolérance immunitaire.

Notre objectif est d'étudier *in vivo* le rôle de ces traitements dans un modèle murin original de ScS, une souris transgénique présentant un phénotype dommageable, seul modèle reproduisant les atteintes sévères de la ScS que sont la fibrose pulmonaire et l'hypertension artérielle pulmonaire, avec une séquence temporelle identique à celle de la maladie humaine. Il n'existe pas d'autre alternative pré-clinique d'évaluation de molécules prometteuses dans la ScS.

200 souris seront nécessaires à ces études réalisées sur une durée de 5 ans.

Les animaux recevront les traitements par voie orale ou par injection intra-péritonéale et seront sacrifiées à l'âge de 18 semaines. L'évaluation de la réponse au traitement se fera par étude des paramètres cliniques, histologie et cytométrie en flux.

Le nombre d'animaux a été réduit au maximum tout en respectant les règles de statistiques. Les soins aux souris seront quotidiens (alimentation, vérification du bien-être des animaux). Le milieu sera enrichi par un nid de coton et une maison garantissant une observation des souris, une

diminution des problèmes d'agressivité dans un groupe. Des points limites ont été établis avec une grille d'évaluation de la douleur qui a été développée spécifiquement pour ce type d'étude. Un score de douleur trop élevé implique l'euthanasie de l'animal avant la fin de l'étude.

A terme, les résultats de ce projet permettront de comprendre plus précisément les mécanismes de régulation de la réponse immunitaire impliqués au cours de la ScS. Ils pourraient permettre le développement de nouveaux médicaments ciblant les voies mises en causes, permettant ainsi de prévenir ou freiner le développement des atteintes fibrosantes et vasculaires chez les patients sclérodermiques.

14528 Les progrès de la neuro-réanimation au cours des dernières décennies permettent à un grand nombre de patients de survivre après un coma lésionnel. Néanmoins, le devenir fonctionnel demeure incertain avec un risque pour le patient de conserver des séquelles majeures. Prévoir l'évolution vers l'éveil et a fortiori vers une récupération fonctionnelle (dans une optique de réinsertion socio-professionnelle et d'amélioration de la qualité de vie) représente un enjeu fondamental d'un point de vue scientifique et clinique pour les patients. Afin d'identifier des marqueurs du fonctionnement cérébral pouvant permettre de prédire l'évolution des patients, de nombreuses études en imagerie cérébrale ont été réalisées chez des patients avec des troubles de conscience et de vigilance. Ces études ont suggéré le rôle important de certaines structures cérébrales profondes, en particulier le thalamus et les ganglions de la base. Il est nécessaire d'approfondir le rôle que ces structures peuvent jouer dans le réveil ou le non-réveil des troubles de conscience et de vigilance. La modélisation de la localisation de ces lésions et leurs conséquences sur le dysfonctionnement cérébrale est une approche qui a été très peu utilisée jusqu'à présent. En particulier, les études réalisées chez l'animal se sont attachées à explorer certains mécanismes physiopathologiques du coma, comme par exemple les mécanismes inflammatoires après un accident vasculaire cérébral. A ce jour, très peu d'études chez l'animal ont exploré le rôle du thalamus et des ganglions de la base alors même que les études réalisées chez les patients soulignent leur rôle crucial. Le volet animal de ce projet de recherche translationnelle d'une durée de 5 ans, aura donc comme objectif de déterminer les régions spécifiques de ces structures sous-corticales qui pourraient moduler les états de vigilance mais qui sont encore inconnues. Pour ce faire, nous utiliserons des approches qui permettent d'inhiber ou d'activer de façon réversible différents sites potentiels de ces structures sous-corticales chez le macaque et d'en mesurer les effets sur les états de vigilances caractérisés par des mesures comportementales et d'imagerie cérébrales multimodale, comme chez les patients. Pour répondre à cet objectif, 6 macaca fascicularis (nombre minimal d'animaux permettant une généralisation des effets) seront exposés à six procédures de sévérité légère (entraînement à une tâche comportementale et examens de neuroimagerie sous anesthésie) à modérée (enregistrements neuronaux avec microstimulations et injections pharmacologiques réversibles par voie générale ou intracérébrale) et une dernière approche, d'injection de traceurs anatomique suivi d'une analyse histologique post-mortem sur seulement 2 animaux. Le choix du modèle primate non-humain (PNH), s'explique par sa proximité anatomo-fonctionnelle avec l'homme. En effet, le cortex cérébral tout à fait lisse des rongeurs n'est pas approprié pour modéliser les interactions complexes entre cortex plissé et structures profondes qui sont présentes chez l'homme. Par ailleurs, les structures sous-corticales dont le thalamus ont beaucoup augmenté en taille et en complexité chez les PNH, les rendant très proches de celles de l'homme. Au cours de ce projet, nous accorderons une attention particulière au raffinement de nos approches d'investigations avec; 1) l'utilisation de l'imagerie cérébrale, non invasive, pour identifier les territoires des structures étudiées, 2) l'utilisation d'approches de perturbation réversibles, non-lésionnelles et reproductibles qui nous permet de réduire le nombre d'animaux et d'améliorer leur bien-être durant la phase expérimentale et 3) d'envisager une sortie de protocole expérimental à la fin du projet de recherche pour 2 de nos animaux

14529 L'adénocarcinome pancréatique est la 4ème cause de mortalité par cancer avec une augmentation importante et régulière depuis les années 80. Son pronostic est extrêmement sombre, avec un taux de survie global à seulement 3% à 5 ans en raison de l'absence de symptômes spécifiques et de

l'absence de diagnostic précoce. Il a été démontré précédemment que 100% des patients présentaient un taux de survie à 5 ans lorsque l'adénocarcinome était inférieur à 1 cm, ce qui prouve l'importance du diagnostic précoce du cancer.

De nos jours, l'IRM est utilisée pour caractériser des anomalies morphologiques pancréatiques telles que néoplasmes, lésions kystiques, pancréatites, métastases ou anomalies congénitales, lorsqu'elles sont apparentes sur les images. Récemment, il a été démontré que l'IRM pouvait potentiellement détecter une pré néoplasie avant l'apparition d'un cancer invasif. Il est donc très important de développer des agents de contraste intelligents pour l'imagerie des lésions précurseurs conduisant à un adénocarcinome pancréatique.

On sait que le zinc (colibéré avec l'insuline) est présent en grande quantité dans cet organe et il a été montré qu'il jouait un rôle dans le développement du cancer du pancréas. La concentration en zinc se situe dans une plage détectable par IRM (μM à mM) en fonction de l'état (physiologique ou pathologique).

Nous nous proposons donc de détecter le zinc *in vivo*, après son co-relargage dans le milieu extracellulaire avec l'insuline stimulé par du glucose dans le cas du cancer du pancréas où il a été montré qu'il y avait une dérégulation de la teneur en zinc. Ces agents de contraste, extracellulaires, seront basés sur des complexes de gadolinium(III) et « s'allumeront » ou « s'éteindront » en présence de zinc. Les complexes de gadolinium sont les agents de contraste de référence utilisés en routine clinique donc sans aucune toxicité sauf dans certains cas d'insuffisance rénale. Nous proposons des molécules dont chaque partie pourra être optimisée indépendamment afin de concevoir le plus efficacement possible les meilleurs agents pour des tests *in vivo*. L'objectif ultime de ce projet est double (1) montrer l'importance de la détection du zinc dans l'adénocarcinome du pancréas en comparant les images de souris saines et de souris possédant des tumeurs xénogreffées dans le pancréas; (2) identifier l'étape la plus précoce de la carcinogénèse à laquelle les modifications de concentration de zinc suffisantes pour être détectées sur les images IRM. L'objectif à long terme de ce projet sera de fournir un diagnostic précoce aux populations à haut risque afin d'accroître leur taux de survie et d'améliorer le suivi des patients après le traitement.

Les dommages attendus sont liés au développement de la tumeur pancréatique. Une évaluation quotidienne visuelle des animaux sera réalisée en s'appuyant sur des grilles de scoring pour anticiper la douleur chez les animaux. Ce projet concerne la réalisation d'imagerie du pancréas avec agent de contraste. Les animaux étant anesthésiés pour les examens d'imagerie.

Ce projet nécessitera 430 souris femelles et sera réalisé en respectant les principes fondamentaux de l'expérimentation animale les 3R.

Remplacement : le modèle animal est fondamental dans notre cas, puisque l'étude préclinique en particulier d'induction de l'adénocarcinome ne peut se faire que sur un organisme vivant entier.

Raffinement : les animaux sont observés scrupuleusement afin de respecter leur bien-être et d'éviter au maximum la douleur au moment de l'expérimentation. Les animaux sont anesthésiés pour les actes IRM. De plus, des points limites prédictifs ont été mis en place.

Réduction : le nombre d'animaux utilisé est réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement pertinents et reproductibles. L'IRM pour le suivi des tumeurs permet aussi de réduire le nombre d'animaux puisque l'intérêt de l'IRM réside dans le fait qu'une même souris peut être observée plusieurs fois dans le temps.

14530 Le mode de vie en groupe d'individus est utilisé par la plupart des Mammifères, incluant notamment les humains et les rongeurs, pour favoriser la survie de l'espèce. La réussite de la vie en groupe repose sur une variété de comportements sociaux complexes (interaction sociale, comportements affiliatifs, socio-sexuels,). Néanmoins, il existe de nombreux troubles du comportement social. Les substrats moléculaires sous-jacents à ces troubles restent méconnus à ce jour.

L'objectif de cette étude est de mettre en évidence chez la souris, seul modèle animal permettant d'utiliser cette technologie, à l'heure actuelle, les substrats moléculaires de l'interaction sociale en comparant des animaux sauvages avec des animaux ayant des déficits d'interaction sociale.

Ces expériences vont significativement contribuer à l'augmentation des connaissances scientifiques de ces troubles, mais également à la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles permettant d'améliorer le bien-être chez les animaux d'élevage et de soulager ces troubles chez l'homme.

Le nombre total d'animaux dans ces expériences sera d'un maximum de 7968 souris. Le projet s'inscrit dans le respect de la règle des 3R

Remplacement il n'y a aucune méthode de remplacement pour l'étude des comportements sociaux.

Réduction Un nombre suffisant de mâles et femelles sont utilisés dans chaque groupe expérimental. Cependant, si aucune différence n'est observée entre mâles et femelles dans les premières expériences, indiquant qu'il n'y a pas d'effet genre, les effectifs seront alors réduits de 50%.

Raffinement La durée des procédures pour chaque animal est la plus brève possible afin de minimiser son inconfort et son stress. De plus, ces expériences ont pour but de déterminer des nouvelles cibles pour améliorer le comportement social, et donc un des éléments de bien-être des animaux. En effet, le repliement social est la première dégradation mineure du bien-être des animaux sociaux (incluant les animaux d'élevage et la souris). Le but de cette étude est l'identification de nouvelles cibles de l'interaction sociale et en agissant pharmacologiquement sur ces cibles, la sociabilité de ces animaux sera rétablie.

14531 Les surdités neuro-sensorielles, « surdités classiques », résultent d'une atteinte ou d'une perte de fonction des cellules sensorielles cochléaires. La réhabilitation des personnes développant de telles surdités passe par un appareillage classique qui en principe est couronné de succès tant que les pertes auditives ne sont pas trop sévères. L'implant cochléaire est la seule neuro-prothèse actuellement disponible et efficace dans le cadre de la réhabilitation des surdités totales (cophose). Son indication est également étendue aux neuropathies auditives. Récemment, une nouvelle entité pathologique auditive a été décrite la surdité cachée. Le concept de « surdité cachée » est né d'observations chez des souris traumatisées par des surexpositions acoustiques. Histologiquement, une perte sélective d'une catégorie de fibres nerveuses auditives (impliquées dans le codage des intensités moyennes à fortes, fibres de hauts seuils) a été caractérisé. Fonctionnellement, il n'y a aucune altération des seuils auditifs et de la fonction cochléaire. Il n'existe actuellement aucun test fonctionnel pré-clinique ou clinique permettant d'objectiver cette entité pathologique. De plus, pour mettre en évidence cette entité physiopathologique, les analyses histologiques cliniques d'oreille interne sont quasiment impossibles. Par ailleurs, les dons de corps ne sont jamais associés à une documentation la plus exhaustive de la fonction auditive des « donneurs ». Il semble donc indispensable de développer de nouveaux outils d'évaluation fonctionnelle basés sur des méthodes électrophysiologiques non invasives. Ces méthodes d'explorations fonctionnelles ont été choisi pour leur similitude avec les méthodes utilisées en clinique humaine et surtout pour leur caractère non invasif n'induisant aucune douleur ou souffrance de l'animal. Ainsi, un profil exploratoire fonctionnel non-invasif caractérisant précisément cette nouvelle entité physiopathologie auditive obtenue sur un modèle animal, pourra sans difficulté être établi chez des patients présents des plaintes particulières (laissant suspecter une « surdité cachée »). La concordance entre profils exploratoires pré-clinique et clinique témoignera d'une atteinte cellulaire identique chez les patients. Ainsi, avec ces éclairages, la prise en charge de ces patients pourra sans doute être plus adaptée. Le cochon d'inde est un animal qui présente une fonction auditive la plus similaire -dans sa physiologie (spectre auditif 500 à 40 000Hz) et dans son codage neural- avec la fonction auditive humain (20 à 20000Hz). Les autres petits rongeurs ont une physiologie plus éloignée, car très haute fréquence (rat 4 000 à 50 000Hz, souris 5 000 à 100 000Hz). Certaines explorations audiologiques comme les otoémissions acoustiques (test de dépistage de la surdité à la maternité, une simple sonde identique à un écouteur de musique est positionnée dans le conduit auditif) peuvent être réalisé chez le cochon d'inde vigile et légèrement mis en contention, alors que le recours à l'anesthésie est incontournable pour les autres petits rongeurs. Les animaux ne subiront aucun traitement aigu ou chronique en dehors de l'injection de produits d'anesthésie. L'objectif de ce projet est (1) de normaliser sur un petit nombre (10) d'animaux « contrôle » (sans pathologie induite) des tests électrophysiologiques et acoustiques chez le cobaye et (2) de disposer d'images histologiques pour

ensuite envisager d'autres projets de recherche avec modélisation de différentes surdités ou atteintes neurales auditives induites (suite à des traumatismes acoustiques ou à des effets indésirables ototoxiques de certaines molécules thérapeutiques). Les animaux ne subiront aucun traitement aigu ou chronique en dehors de l'injection de produits d'anesthésie. En effet, le Laboratoire dispose d'une solide expertise sur d'autres modèles animaux (souris, rat, gerbille) et souhaite développer ses compétences sur le cochon d'inde car des collaborations scientifiques sont prochainement envisagées avec des collègues qui utilisent également le cochon d'inde, et surtout dans le cadre des études de réhabilitations des surdités avec des implants cochléaires (dimension anatomique des cochlées sont sensiblement identiques entre l'homme et le cochon d'inde).

14532 La schizophrénie est un trouble mental sévère. Elle apparaît généralement au début de l'âge adulte et affecte environ 1% de la population. La schizophrénie comprend différents symptômes, nommés symptômes positifs (hallucinations, délires), symptômes cognitifs (désorganisation de la pensée, déficits de l'attention et de la mémoire) et symptômes négatifs (anhédonie, apathie, désintérêt social). Les composés utilisés pour le traitement de la schizophrénie sont les neuroleptiques

Le test d'hyperactivité à l'amphétamine est un modèle animal reconnu des symptômes positifs de la schizophrénie. Son principe est de mesurer l'effet d'un composé sur l'hyperactivité locomotrice induite par l'amphétamine chez la souris. Les neuroleptiques qui réduisent les symptômes positifs de la schizophrénie chez l'homme diminuent l'hyperactivité induite par l'amphétamine chez la souris. Le test d'hyperactivité à l'amphétamine est un modèle largement utilisés pour la recherche de nouveaux neuroleptiques.

Le nombre maximum de produits testés par an est de 50.

Le nombre total maximum de souris utilisées sur 5 ans est de $18\ 000 = 72 \text{ animaux/étude} \times 50 \text{ études/an} \times 5 \text{ ans}$.

Respect de la règle des 3R

- Réduire. Le nombre total d'animaux utilisés pour une étude est fonction du nombre de groupes et du nombre d'animaux par groupe nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement interprétables.

o Justification du nombre de groupes. Les groupes témoin et amphétamine seule sont nécessaires à chaque expérience compte tenu des variations d'activité entre lots d'animaux. Le groupe amphétamine plus neuroleptique de référence est nécessaire pour valider l'expérience et pour comparer l'efficacité du produit testé à un produit de référence. Il est nécessaire de tester le produit à trois doses pour mesurer la relation dose-effet.

o Justification du nombre d'animaux par groupe. Compte tenu de la variabilité interindividuelle des variables mesurées dans ce test, ce nombre a été fixé à 12 animaux par groupe. L'utilisation d'un nombre inférieur d'animaux a une probabilité importante d'entraîner la non-validité de l'étude, conduisant à la refaire, et par conséquent à utiliser un nombre d'animaux plus élevé.

- Raffiner. Des animaux présentant des signes de souffrance sont euthanasiés. Outre la motivation éthique conduisant à cette euthanasie, celle-ci est requise pour des raisons expérimentales, la souffrance d'un animal biaisant les variables comportementales mesurées. L'utilisation de traitements pour pallier à cette souffrance est exclue, ces types de traitement étant susceptible de modifier le comportement des animaux et l'action pharmacologique des produits étudiés.

- Remplacer il n'existe pas à ce jour de modèle n'utilisant pas d'animaux ou nécessitant un nombre plus réduit d'animaux ou ayant un degré de sévérité inférieur permettant d'obtenir des informations équivalentes à celles obtenues par le présent modèle.

14533 Le cancer du sein est la première cause de mortalité dans le monde chez les femmes, avec une incidence de 52 000 cas estimés en France. Certains de ces cancers sont très agressifs. Malgré les nombreux progrès réalisés au cours des dernières années dans le domaine de la prévention, la détection précoce et le traitement du cancer, cette maladie reste un problème majeur de santé publique. La forte mortalité associée à ce cancer dépend notamment du développement des métastases, pour lesquelles il n'existe à ce jour aucun marqueur ni traitement spécifique. Les

phénomènes qui conduisent à la formation des métastases sont complexes et font intervenir de multiples paramètres tels que l'invasion de la matrice extracellulaire, la survie et la distribution dans la circulation lymphatique/sanguine, la furtivité vis-à-vis du système immunitaire et la colonisation d'organes à distance de la tumeur primaire. Il est primordial de déterminer les mécanismes impliqués dans la progression métastatique afin d'individualiser des facteurs pronostics, ainsi que des cibles thérapeutiques. Ces phénomènes complexes ne peuvent pas s'étudier exclusivement *in vitro* et nécessitent l'utilisation de modèles animaux.

Le projet représente un ensemble d'études types qui pourront viser à comprendre des mécanismes impliqués dans la progression tumorale ou à évaluer l'efficacité thérapeutique de nouveaux traitements.

Le projet pourra comporter jusqu'à 15 études. Une étude comportera jusqu'à 60 souris ce qui portera le nombre d'animaux à 900 souris maximum. Pour cela, les animaux seront greffés par des cellules tumorales afin de modéliser un cancer du sein. Les dommages attendus sont liés au développement d'une tumeur mammaire et éventuellement à l'apparition de foyers tumoraux secondaires (métastases).

Ce projet qui mettra en oeuvre des approches par imagerie *in vivo* sera réalisé en respectant la règle des 3R

Raffinement les animaux seront étudiés par imagerie *in vivo* non invasive ce qui n'induit pas de douleur et permet de réduire le stress infligé au cours de l'expérimentation.

Réduction la mise en oeuvre de l'imagerie permet de réaliser un suivi longitudinal des animaux et ainsi de réduire le nombre d'animaux nécessaires à l'obtention de données.

Remplacement les informations attendues ne peuvent pas être obtenues *in vitro* car à ce jour l'animal de laboratoire reste le seul recours permettant d'étudier le développement tumoral et l'efficacité thérapeutique en tenant compte de la complexité de la physiologie d'un organisme vivant.

14534 Les succès récents obtenus en thérapeutique anticancéreuse au moyen d'agents appelés « inhibiteurs de checkpoint » démontrent que la restauration d'une bonne immunité chez les sujets porteurs de tumeurs malignes est un élément essentiel et même pratiquement obligatoire pour obtenir la guérison de ces patients. Notre équipe a mis en évidence les effets délétères d'une protéine immunosuppressive appelée galectine-9 (gal-9) dont les effets se font sentir dans plusieurs types de cancers humains par exemple dans les cancers du cavum (en arrière des fosses nasales) ainsi que dans les cancers du pancréas et du rein et dans les mélanomes malins. Poursuivant des objectifs qui sont à la fois des objectifs de recherche fondamentale et d'application thérapeutique, notre équipe a produit des anticorps monoclonaux qui sont capables *in-vitro* de neutraliser les effets immunosuppressifs de la gal-9.

Pour pouvoir envisager sérieusement l'utilisation d'agents thérapeutiques dérivés de ces anticorps monoclonaux, il est nécessaire d'avoir la preuve de leur capacité d'action et de l'absence d'effets secondaires inacceptables en les soumettant à des tests d'efficacité et de sécurité dans des organismes entiers. Comme la grande majorité des immunomodulateurs, la gal-9 exerce ses effets sur un grand nombre de types cellulaires. Il est donc impossible d'anticiper la résultante de tous ces effets combinés dans un organisme entier sans passage par un mammifère vivant. C'est la raison pour laquelle il n'existe pas d'alternative possible à des évaluations de nos anticorps sur des modèles murins de lignées tumorales riches en gal-9. Ceci doit nous permettre d'avoir des arguments solides pour ou contre la préparation d'un éventuel essai clinique. Un élément favorable dans ce contexte est le fait que nos anticorps monoclonaux anti-gal-9 réagissent aussi bien avec la protéine humaine qu'avec la protéine murine.

C'est pourquoi nous nous proposons d'utiliser des lignées de cancer de souris produisant de la gal-9 qui seront inoculées à des souris de même groupe tissulaire (syngéniques). Ces souris seront ensuite traitées soit avec des anticorps témoins soit avec des anticorps anti-gal-9 soit avec des anticorps anti-gal-9 couplés à de faibles doses de doxorubicine (un agent classique de la chimiothérapie anti-tumorale). Ainsi nous verrons si les anticorps anti-gal 9 associés ou non à la doxorubicine permettent de ralentir la croissance tumorale ou même de faire régresser ces tumeurs.

Cette évaluation des effets antitumoraux sera accompagnée par une étude de l'impact des tumeurs et des anticorps anti-gal-9 sur les cellules du système immunitaire. En retirant le maximum d'informations cliniques et biologiques de chacun des animaux utilisés lors des évaluations, nous prévoyons d'arriver à une preuve de concept avec un effectif d'au maximum 300 souris, ce qui est statistiquement le minimum possible.

Il est à noter que notre équipe développe des outils de suivi des paramètres immunitaires (immuno-monitoring) pour la gal-9 qui devraient permettre à l'avenir de tirer le maximum d'informations des essais cliniques chez l'homme et peut-être même chez des animaux domestiques victimes de tumeurs spontanées. Ces outils nous aideront dans le futur à limiter le recours à l'expérimentation animale pour l'étude des anticorps anti-galectine-9.

Les souris seront anesthésiées pour toutes les procédures expérimentales (localement pour les injections simples et généralement pour les greffes). La contrainte pour les animaux sera la greffe de tumeurs de tailles modérées et leur mesure. Les animaux bénéficieront d'un suivi clinique avec pesée tous les deux jours. Les animaux bénéficieront de DietGel en récupération d'anesthésie, et d'enrichissement (nestlets, maisons en carton).

14535 Au jour d'aujourd'hui, le cancer du foie reste une pathologie incurable, ne disposant d'aucun traitement efficace. En effet, la plupart des essais cliniques réalisés contre ce cancer cherchent à valider des molécules développées dans d'autres pathologies, et pas spécifiquement dans le contexte du cancer du foie. Dans ce projet, nous avons recours à une méthode d'analyse des protéines (protéomique) précédemment validée afin d'analyser dans un premier temps les protéines accessibles spécifique des lésions d'hépatique. Cette analyse globale nous a permis d'identifier de nouveaux candidats biomarqueurs, qui serviront de base à l'établissement de nouvelles thérapies ciblées utilisant des anticorps couplés à des molécules cytotoxiques. Nous sommes actuellement en train d'étudier la fonction de plusieurs de ces cibles, de façon à comprendre, d'une part, leur rôle dans la progression du cancer du foie et, d'autre part, de pouvoir développer nos propres anticorps contre les candidats jugés les plus prometteurs.

Pour l'expérience envisagée, il n'existe pas une méthode alternative n'utilisant pas d'animaux. La présente étude prévoit d'implanter directement dans le foie des souris immunodéficientes (athymic nude) des cellules fibroblastes surexprimant ou sous-exprimant nos protéines d'intérêt avec des cellules cancéreuses hépatiques Luc+ comme modèle pour étudier le cancer hépatique.

Ces souris serviront à évaluer l'importance de nos protéines du tissu conjonctif dans la croissance tumorale.

Les 3 R sont pris en considération de la façon suivante :

Réduire : Une étude statistique a été menée en amont du projet afin d'évaluer le nombre d'animaux nécessaire pour avoir des résultats scientifiques statistiquement pertinents. Nous réalisons également un suivi longitudinal des animaux en utilisant des techniques d'imagerie qui nous permettent de réduire le nombre d'animaux utilisés.

Remplacer : Des modèles *in vitro* ont été mis en œuvre en amont du projet afin de ne poursuivre des expérimentations *in vivo* uniquement sur des cibles thérapeutiques ayant déjà démontré un intérêt *in vitro*.

Raffiner : Les techniques d'imagerie *in vivo* non invasive et non ionisante qui vont être utilisées nous permettent de détecter les signes de développement de la maladie avant l'apparition de signes cliniques plus sévères. Pour améliorer le quotidien des souris ayant ou non un phénotype dommageable, des matériaux de litière ou des structures de repos adaptés sont installés dans les cages (mouchoir en papier, rouleau en carton...)

Au total nous avons prévus d'inclure 192 souris dans ce projet scientifique.

14536 Le cancer colorectal représente un défi majeur de santé publique en raison de sa gravité et de l'augmentation croissante des cas nouvellement diagnostiqués en France et à travers le monde. Malgré des avancées significatives en termes de survie grâce aux chimiothérapies à base d'anticorps thérapeutiques, certains patients ne répondent pas ou peu aux traitements. Il est donc

nécessaire de développer de nouvelles stratégies afin d'améliorer l'efficacité anti-tumorale et de lutter contre les phénomènes de résistance.

La littérature scientifique décrit abondamment l'implication des canaux ioniques, protéines qui laissent ou non passer les ions sous certaines conditions, et leur dérégulation au cours du développement tumoral. Ils sont aussi considérés comme des biomarqueurs potentiels d'efficacité des traitements.

Ce projet a pour objectif d'évaluer des approches originales dans des modèles murins de cancer colorectal

1-en ciblant des processus physiopathologiques médiés par les flux de potassium et de calcium, des cations essentiels à de nombreuses fonctions cellulaires, qui sont de fait dérégulées en cas de cancer.

2-en utilisant la curcumine, un composant naturel bien connu des régimes alimentaires en Asie, comme modulateur des canaux ioniques. La curcumine possède de nombreuses actions anti-tumorales et des essais cliniques sont en cours pour évaluer son utilisation dans la prévention du cancer colorectal ou en association avec la chimiothérapie ou la radiothérapie.

Ce projet mettra en œuvre 312 souris au maximum. Les dommages attendus pour les animaux sont liés au développement de foyers tumoraux au niveau sous-cutané ainsi qu'au niveau du colon et potentiellement de métastases au niveau viscéral. Les actes d'induction tumorale et d'imagerie seront réalisés sous anesthésie générale. Par ailleurs, des points limites prédictifs ont été définis afin d'anticiper, le cas échéant, tout stress ou souffrance qui pourraient être générés chez la souris. Dans ce contexte, nous appliquerons les principes de la règle des 3R

- Remplacement l'étude de tumeurs ou métastases résulte de l'interaction de nombreux types cellulaires et ne peut pas être modélisée *in vitro*. Aucune autre méthode expérimentale ne serait en mesure d'apporter un niveau équivalent d'information que la procédure expérimentale impliquant l'utilisation d'animaux vivants.

- Réduction Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est réduit au minimum sans toutefois compromettre les objectifs. Les groupes témoins seront regroupés lorsque cela sera possible. La mise en œuvre de l'imagerie (bioluminescence et échographie) permettra de suivre le même animal au cours du temps ce qui permet de réduire significativement leur nombre.

- Raffinement Les méthodes d'imagerie mises en œuvre sont non invasives et les actes réalisés sous anesthésie. Par ailleurs, les souris seront hébergées en portoir ventilé et en accord avec les directives européennes et dans un environnement enrichi. Des grilles de scoring avec les points limites prédictifs seront mis en place et le personnel examinera les animaux quotidiennement afin d'anticiper la souffrance de l'animal. De plus, nous utiliserons des antalgiques lors de la chirurgie.

14537 L'objectif principal du projet est d'évaluer les relations entre efficacité alimentaire individuelle, métabolisme et robustesse chez une espèce majeure dans la pisciculture européenne, le bar *Dicentrarchus labrax*. L'efficacité alimentaire (EA, rapport entre la croissance et la quantité d'aliment ingérée par chaque poisson) est un caractère essentiel à la fois pour améliorer l'efficacité économique des élevages et pour réduire leur impact environnemental (moins de ressources consommées, moins de déchets excrétés pour un même niveau de production). Récemment, notre équipe a mis au point une technique qui permet de mesurer l'EA individuelle des poissons, qui ouvre des perspectives de programmes de sélection de souches efficaces en pisciculture. Afin d'améliorer la sélection de ce caractère, il est important de comprendre les mécanismes physiologiques sous-jacents à l'origine des variations inter-individuelles de l'EA, et les possibles corrélations entre l'EA individuelle et d'autres traits phénotypiques pertinents. L'ensemble de ce projet testera, par des approches expérimentales et corrélatives, si l'EA individuelle est corrélée avec (1) le taux métabolique (les « coûts de la vie ») et (2) des traits physiologiques liés à la notion de « robustesse », tels que la performance cardiorespiratoire et la capacité à tolérer des stress environnementaux majeurs tels qu'une réduction dans la disponibilité d'oxygène (hypoxie) ou un réchauffement de l'eau.

Ce dossier éthique couvre les procédures d'expérimentations sur animaux prévues dans ce projet :

- 1) Marquage intramusculaire par puce pour identification individuelle.
- 2) Mesure de traits de métabolisme et de tolérance à l'hypoxie par mesures de la consommation d'oxygène (respirométrie) en chambre métabolique.
- 3) Mesure de traits de performance physiologique et de tolérance au réchauffement par respirométrie en couloir de nage.

Les protocoles suivent la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner) :

- Remplacer : Ce protocole ne comporte pas de remplacement, car il est nécessaire de faire des mesures directement sur les poissons pour l'instant.

- Réduire : Les mesures de respirométrie en chambre métabolique seront réalisés sur 200 poissons marqués individuellement, issus d'une étude de leur EA individuelle, permettant une estimation précise et fiable des relations entre les variables mesurées. Les effectifs ont été calculés à partir de données d'expérimentations précédentes et de la littérature pour assurer une puissance de détection suffisante des effets escomptés. Pour les mesures en couloir de nage, nous sommes limités à 60 individus pour des raisons de faisabilité technique. Ces individus seront choisis parmi les extrêmes d'EA individuelle. Les animaux seront tous gardés en vie pour être utilisés dans des programmes de sélection.

- Raffiner : Tout a été mis en place dans le cadre des procédures pour limiter la souffrance et le stress des animaux pendant les mesures. Les procédures de respirométrie in-vivo sont bien établies chez les poissons et sont des techniques largement maîtrisées et utilisées par l'ensemble de la communauté scientifique, ainsi que par notre équipe. L'objectif des protocoles est de limiter au maximum la souffrance et le stress des animaux, avec capture des poissons sous l'eau et placement dans les respiromètres sans exposition à l'air, suivi par une durée minimale d'acclimatation de 12h. Les poissons sont à l'abri de toute nuisance visuelle et sonore pendant la récupération et les expériences. Cela permet d'obtenir des mesures physiologiques valides et fiables, qui ne sont pas influencées par un état de souffrance, stress ou agitation de l'animal. En dehors des mesures en respirométrie, les poissons seront conservés dans la station de recherche en pisciculture, à une densité optimale dans des bassins internes isolés des perturbations humaines, avec une alimentation journalière « ad-libitum ».

14538 L'exposition aux rayonnements ionisants suite à un accident d'irradiation peut engendrer des conséquences graves sur la santé des personnes exposées et impacter potentiellement un grand nombre de personnes. L'irradiation d'un large volume à des doses d'irradiation moyennes à fortes induit des lésions tissulaires multiples regroupées sous le nom de syndrome aigu d'irradiation. La rapidité d'apparition des premiers symptômes dépend de la vitesse de renouvellement des cellules constituant les tissus lésés mais aussi de la radiosensibilité des cellules souches. Chez l'homme, les doses supérieures à ≈ 6 Gy sur un large volume induisent principalement une destruction de la moelle osseuse et des lésions gastro-intestinales, entraînant diarrhée, déshydratation, septicémie, hémorragie intestinale avec une mortalité dans les 10 à 15 jours suivant l'exposition. Ces symptômes gastro-intestinaux sont collectivement connus sous le nom de syndrome gastro-intestinal radio-induit (SGI). Bien que la recherche de contre-mesures médicales pour traiter le SGI ait été initiée il y a plus de 50 ans, l'efficacité et l'innocuité des traitements envisageables restent insatisfaisantes. Sur la base d'études expérimentales, il est admis que la fenêtre temporelle d'intervention après exposition aux radiations est très courte, entre 24 à 48 heures seulement, et donc primordiale afin d'espérer une efficacité thérapeutique optimale et pérenne des traitements. Il existe donc un besoin crucial de mesures thérapeutiques efficaces et rapides pour la gestion du SGI avec l'éventualité d'un traitement d'un nombre très important de victimes militaires ou civiles. Aujourd'hui les médicaments en cours de développement sont exclusivement des agents à potentiel radio-protectant ou radio-mitigateur.

L'objectif du projet est de faire la preuve de concept d'une prise en charge multimodale du syndrome gastro-intestinal. Nous voulons démontrer l'intérêt d'associer une protection physique lumineuse par

un biomatériau innovant à une biothérapie combinée à la fois pro-régénérante de la muqueuse digestive et immuno-modulatrice. Ce projet sera réalisé sur le modèle rongeur de souris comme modèle préclinique de syndrome gastro-intestinal.

Pour l'ensemble du projet, le nombre estimé d'animaux est de 1500 souris C57BL/6J. Dans le but d'évaluer les bénéfices thérapeutiques de produit cellulaires et particulièrement pour le passage en clinique, l'utilisation de l'animal s'avère indispensable. Le nombre de souris choisi pour ce protocole est nécessaire et suffisant pour exploiter d'un point de vue statistique les résultats obtenus.

Dans le contexte du bien-être animal, le raffinement est assuré par le fait que ces animaux seront anesthésiés, prélevés et euthanasiés selon la réglementation en vigueur (anesthésie pour irradiations et prélèvements sanguins, respect des bonnes pratiques etc...). Des points limites seront définis et appliqués tout au long des procédures expérimentales constituant ce projet.

14539 Les maladies chroniques du foie d'origine non alcoolique (NAFLD) sont caractérisées par une stéatose hépatique, c'est-à-dire une accumulation de graisses dans le foie dans plus de 5% des cellules hépatiques, en absence de toute consommation d'alcool ou d'hépatite liée, à une infection virale à une consommation de médicaments ou une maladie auto-immune. Elles sont, dans la majorité des cas, considérées comme une maladie bénigne du foie. Si la prévalence des NAFLD est de 25% dans la population mondiale, certains patients (~10-40% des personnes atteintes de NAFLD) développent une manifestation plus sévère de la stéatose la stéato-hépatite d'origine non alcoolique (NASH) qui se caractérise alors par une accumulation de gouttelettes lipidiques dans les hépatocytes, une ballonnisation hépatocytaire et une inflammation pouvant aboutir à une fibrose. Dans les cas extrêmes, la NASH peut évoluer vers une cirrhose non alcoolique voire un hépatocarcinome. La mortalité chez ces patients atteints de NASH est d'environ 7% dans la population générale et peut atteindre 36% chez des personnes souffrant de maladies cardio-vasculaires. Actuellement, seules des modifications de comportement alimentaire et physique sont utilisées pour réduire l'impact des NAFLD/NASH, et il n'existe aucun traitement thérapeutique dans cette indication précise.

Dans le cadre de ce projet, la NASH sera induite chez des souris par un régime carencé en méthionine et choline. Ces deux acides aminés sont impliqués dans le métabolisme des lipides et surtout dans leur élimination du foie. Ainsi la carence en méthionine et en choline provoque une accumulation des graisses dans le foie, favorisant ainsi rapidement le développement de la NASH.

Ce projet a 2 objectifs

1) évaluation pharmacocinétique de candidats médicaments, i.e. mesure de la concentration des candidats médicaments dans le plasma ou les organes au cours du temps suivant une administration unique ou répétée du composé, dans le modèle pathologique de NASH murin induit par un régime carencé en méthionine et choline pendant une semaine avant l'étude

2) caractérisation des candidats médicaments pré-sélectionnés dans des tests *in vitro* sur des critères d'efficacité sur les cibles d'intérêt sur le développement de la NASH dans ce modèle. Pour ce second objectif, l'induction de la pathologie par le régime carencé en méthionine et choline et le traitement avec le candidat médicament sont débutés simultanément. Il s'agit ainsi d'un modèle préventif et rapide qui permet de sélectionner les composés dont l'efficacité curative sera évaluée dans des modèles de NASH curatifs et longs. L'évaluation sera faite sur des critères d'histologie ainsi que sur des paramètres métaboliques mesurés à partir de prélèvements sanguins et tissulaires réalisés sous anesthésie et analgésie.

Les études réalisées dans le cadre de ce projet permettront ainsi de documenter la concentration dans le plasma ou dans les organes, le mécanisme d'action des composés et d'évaluer leur effet sur le développement de la NASH. A l'heure actuelle, l'effet potentiel d'un composé sur la stéato-hépatite ne peut être évalué qu'après un traitement chronique chez l'animal car il résulte de l'intégration de toutes les interactions hormonales, inflammatoires et neuronales contrôlant l'ensemble des tissus impliqués dans la pathologie hépatique. Une telle intégration n'existe pas pour des cellules ou organes isolés. Il n'y a donc pas à ce jour de méthodes *in vitro* pouvant se substituer totalement à l'approche *in vivo*.

Le modèle de NASH induit par un régime carencé en méthionine et choline est très bien décrit chez la souris et beaucoup moins dans les autres espèces. C'est pourquoi cette espèce sera utilisée dans ce projet. Les souris sont utilisées à l'âge adulte et sont hébergées en groupes sociaux dans des cages enrichies de bâtonnets de bois, de coton, de litière adaptée et de maisonnettes en plastique. Tous ces éléments leur permettent d'exprimer leurs comportements naturels tels que le fouissage, l'exploration ou encore la nidification. La perte de poids induite par la diète pouvant dépasser 25%, les souris feront l'objet d'une observation visuelle et comportementale quotidienne ou biquotidienne, ainsi que d'un suivi de poids, de prise alimentaire et de prise hydrique régulier.

Afin de réduire le nombre d'animaux, une analyse statistique de l'effectif nécessaire a été réalisée dans ce modèle sur quelques études. Dans le cadre de notre approche de recherche de nouvelles molécules, plusieurs type d'études pourront être réalisées évaluation pharmacocinétique des composés médicament, évaluation d'un composé à une dose (1 composé vs une référence), évaluation d'un composé en dose croissante (4 doses vs une référence). Ainsi la prévision de souris pour toute la durée du projet (5 ans) est de 8090 souris.

14540 Ce projet a pour but d'approfondir les données expérimentales concernant l'activité d'un médicament antiépileptique (ou d'un de ses dérivés). Nous allons étudier en particulier les effets de ce médicament dans une autre forme d'épilepsie que celle pour laquelle il est prescrit l'épilepsie de type absence atypique, qui est une forme d'épilepsie mal contrôlée par les traitements actuels. Cette épilepsie apparaît chez l'enfant, et est souvent accompagnée de retards de développement et d'apprentissage.

L'étude de l'épilepsie et de médicaments antiépileptiques implique d'étudier des circuits neuronaux complexes qui ne peuvent être modélisés *in vitro* sur des cultures de cellules. Des modèles animaux seront utilisés, et le nombre d'animaux impliqués dans l'étude est le nombre minimum permettant d'obtenir des résultats analysables d'un point de vue statistique et représentatifs (soit 12 animaux par groupe). Les modèles utilisés sont des modèles pharmacologiques qui ont été largement validés dans la littérature.

Dans un premier modèle, une molécule chimique est administrée chez le rongeur nouveau-né à 4 reprises, par la voie sous-cutanée, tous les 6 jours, débutant à 2 jours d'âge, et jusqu'à 20 jours. A l'âge adulte (>1 mois et demi), l'animal développe des crises d'épilepsie absence. D'autres modèles sont induits par administration de molécules chimiques chez le rongeur adulte, qui entraîne l'apparition transitoire de crises d'épilepsie absence.

L'enregistrement électro-encéphalographique des animaux à l'âge adulte (mâles et femelles) permettra de mesurer les effets du composé antiépileptique sur la survenue des crises. Des tests comportementaux seront également effectués sur les animaux, afin de mesurer les effets bénéfiques potentiels sur les déficits comportementaux observés dans les modèles d'épilepsie.

En parallèle, l'étude *ex-vivo* des cerveaux prélevés permettra d'étudier les mécanismes d'action des composés étudiés dans ces différents modèles.

Les composés étudiés seront comparés à un médicament antiépileptique de référence.

Dans le cas où les premiers résultats seraient négatifs, un dérivé du composé pourra être testé.

Le nombre maximum d'animaux (rats et souris) par modèle d'épilepsie sera donc de 2 (espèces) x 12 (animaux) x 2 (sexes) x 5 groupes (3 doses + véhicule+ référence) x 2 traitements (1 médicament + 1 dérivé) x 2 régimes d'administration (aigu ou chronique) = 960

Il y aura 2 modèles obtenus par administration chez l'adulte, et un modèle par administration chez le nouveau-né.

Le modèle chez le nouveau-né nécessite 120 femelles gestantes (avec une moyenne de 8 animaux par portée). Soit au total un maximum de $(960 \times 3) + 120 = 3000$ animaux maximum (rats et souris) sur une durée de 5 ans.

La survenue d'une souffrance ou d'un stress chez les animaux sera identifiée et des mesures seront mises en oeuvre pour la réduire au minimum (définition de points limites). Ils sont hébergés en groupe, dans un environnement enrichi (tunnel, mouchoirs), et des bilans d'étape lors du

déroulement du projet permettront de raffiner les conditions expérimentales et/ou les protocoles utilisés.

14541 Notre recherche pharmaceutique concerne différentes pathologies humaines (cardio-métabolisme oncologie, immuno-inflammation, maladies neurodégénératives, etc...)

Au cours du développement de tout médicament, quelle que soit la pathologie, il est important de dérisquer précocement un effet délétère cardiaque, le risque de troubles du rythme voir de fibrillation cardiaque, Ce type d'effet chez l'Homme pouvant conduire au décès.

Pour cela il existe un test *in vitro* qui permet d'identifier le risque nul ou sévère d'apparition de ces évènements. Cela nous permet de prendre la décision de poursuivre ou non les explorations fonctionnelles de futurs candidats médicamenteux dans leur axe thérapeutique.

En revanche, une partie de ces candidats médicaments peuvent avoir une réponse intermédiaire à ce test *in vitro*. Il est donc important de valider l'innocuité de ces candidats sur le risque de troubles du rythme par un test sur l'animal vigile maintenu dans son environnement habituel.

L'étude sur l'animal est donc complémentaire à l'étude *in vitro*. On appelle cela de la pharmacologie de cardio-sécurité.

Réaliser cette pharmacologie de cardio-sécurité très en amont des projets, permet de réduire le nombre de candidats-médicament à étudier et donc de diminuer le nombre d'études sur l'animal.

Le but de ce projet consiste à suivre les effets de candidats médicaments sur l'électrocardiogramme du cobaye vigile par mesure à distance en continue grâce à la 'télémétrie'. Ceci va contribuer à la sélection très précoce de candidats médicaments sur le critère de leur innocuité. Pour cela, l'animal sera préalablement instrumenté d'un capteur de télémétrie.

La technologie de télémétrie permet la mesure de plusieurs paramètres stabilisés pendant plusieurs mois, de sorte que les animaux peuvent être utilisés comme leurs propres contrôles réduisant ainsi la variabilité des données et donc le nombre d'animaux nécessaire par groupe. La possibilité d'enregistrer en continu les paramètres de télémétrie sans manipulation de l'animal, libre de ses mouvements dans son environnement habituel permet d'améliorer la qualité et la quantité des données en raison de l'absence de facteurs de stress (manipulation, contention). Ces animaux peuvent être également utilisés pour plusieurs études en respectant des périodes d'élimination du produit testé entre chaque phase de mesure, contribuant ainsi à la réduction du nombre d'animaux nécessaire.

Pour ces études, le cobaye a été choisi comme étant l'espèce la plus prédictible des troubles du rythme chez l'Homme de par sa grande similitude dans le mécanisme d'action des canaux cardiaques majeurs (hERG, Nav1.5, Cav1.2).

Une première étape (procédure 1) consiste en la mise au point de la chirurgie des capteurs de télémétrie, puis l'étape finale (procédure 2) vise à étudier l'innocuité de candidats médicament.

Durant l'ensemble de nos études l'état général des cobayes sera suivi quotidiennement afin de détecter et d'anticiper tout signe de souffrance. Le nombre d'animaux prévu par groupe est déterminé en collaboration avec notre département de bio-statistiques. Enfin, les cobayes seront en cages individuelles lors d'étude de 24h et sinon essentiellement maintenus par deux minimum en cages enrichies d'éléments visant à leur permettre d'exprimer leurs instincts (bâtons de bois à ronger, tunnel pour se reposer).

En cas de manifestation de signes cliniques, l'animal sera pris en charge pour des soins vétérinaires.

Dans ce projet nous estimons nécessaire l'utilisation de 876 cobayes 36 pour la procédure 1, et 840 pour la procédure 2 pour une durée de 5 ans.

14542 Nos sociétés abondantes en aliments très palatables, car riches en sucre et en graisse, favorisent la prévalence de mauvaises habitudes alimentaires dès l'enfance ou l'adolescence. Ces comportements précoces peuvent affecter durablement les choix alimentaires adultes.

Il a été montré que l'adolescence est une fenêtre critique de vulnérabilité au cours du développement cérébral, caractérisée par des comportements spécifiques et une sensibilité accrue aux récompenses. Les données récemment acquises sur le rat indiquent qu'une surconsommation de sucre pendant l'adolescence altère durablement la sensibilité et la motivation à consommer des aliments palatables (dont la qualité gustative et la texture sont agréables au palais) à l'âge adulte et fait émerger un profil comportemental spécifique, rappelant la dépression, pouvant être reversé par un antidépresseur. De même, il a été mis en évidence qu'une alimentation hautement palatable à l'adolescence pouvait altérer la maturation des circuits cérébraux du plaisir alimentaire, encore en cours de développement, modifiant ainsi durablement l'impact hédonique des aliments et impactant le comportement alimentaire à l'âge adulte. Des processus neurobiologiques affectant la perception sensorielle plaisante ou non des aliments ont ainsi pu être mis en évidence et il apparaît qu'une modification du plaisir alimentaire et de la sensibilité des systèmes de récompense pourrait être l'un des déterminants clés des dérèglements du comportement alimentaire.

Ce projet concerne le rôle des récepteurs dopaminergiques cérébraux dans les effets à long terme d'une surconsommation de sucre pendant la période d'adolescence. Il s'agira de vérifier si les baisses de quantité de récepteurs dopaminergiques, notamment au niveau du noyau accumbens, se traduisent comportementalement lorsque nous allons stimuler ces récepteurs directement dans cette structure. Si tel est le cas, nous devrions pouvoir permettre une récupération de tous ou certains déficits comportementaux produits par la surconsommation de sucre pendant l'adolescence tels que la baisse de réactivité hédonique et la baisse de motivation pour des récompenses palatables.

Ce projet implique au total 96 rats pour lesquels nous allons respecter au mieux les principes de Réduction, Raffinement et Remplacement. Les effectifs des animaux ont en effet été ajustés au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiques, tout en tenant compte des variations interindividuelles et du pourcentage de perte lors des chirurgies. Les animaux sont hébergés dans des animaleries thermorégulées et disposent d'un milieu enrichi. Ils sont manipulés régulièrement afin d'inhiber tout stress et sont observés quotidiennement afin de réagir au plus vite en cas d'apparition de signes de souffrance. Etant particulièrement vigilants à la prise en charge de la douleur, nous avons mis en place des points limites spécifiques et précoces, des mesures prophylactiques et analgésiques adaptées, ainsi que des procédures de suivi post-chirurgicales permettant de diminuer au maximum l'impact des chirurgies. Ne pouvant remplacer ce modèle animal par un modèle *in vitro*, il s'avère que le rongeur est une espèce de choix pour l'étude des processus neurobiologiques car il peut être extrapolé à l'homme.

14543 L'abus d'alcool est un problème de santé publique majeur avec environ 450 millions de personnes concernées dans le monde. L'étiologie de l'abus d'alcool comporte des facteurs individuels (ex génétique) et environnementaux. Un facteur environnemental majeur est le stress car il provoque la recherche d'une sensation de soulagement. Les mécanismes biologiques derrière les effets hédoniques de l'alcool et ses interactions avec le stress restent cependant méconnus.

Notre équipe s'intéresse aux circuits neuronaux, c'est-à-dire à des ensembles de régions cérébrales composées de cellules neuronales (neurones) qui s'activent de manière coordonnée pour réaliser une fonction cognitive complexe. Nous savons que l'alcool dérégule le circuit de la récompense dans le cerveau et que l'activité des neurones de ce circuit est également très sensible au stress. De plus, nous savons qu'il existe une structure dans le tronc cérébral qui régule l'activité du circuit de la récompense, en particulier durant un stress. Dans ce projet, nous étudierons s'il est possible de réguler indirectement la prise d'alcool suite à un stress en prenant le contrôle de cette structure du tronc cérébral.

Pour ce faire, nous avons donc besoin d'un modèle animal car nous devons réguler l'activité de circuits cérébraux complexes puis effectuer des mesures comportementales. La souris est le modèle idéal car c'est le plus petit animal chez lequel la complexité de ces circuits est préservée par rapport à l'Homme. De plus, les comportements d'abus d'alcool se retrouvent également chez la souris, avec des symptômes similaires à ceux de l'Homme (addiction, etc.). Enfin, nous disposons

de tous les outils biologiques nous permettant de prendre le contrôle des régions cérébrales de notre choix chez la souris.

Le premier objectif de ce projet sera de produire un modèle murin d'abus d'alcool suite à un stress chronique afin d'en mesurer les conséquences sur la communication entre les différentes structures cérébrales du circuit de la récompense.

La consommation d'alcool n'entraîne pas de souffrance notable chez l'animal car les doses d'alcool utilisées sont similaires à celles de boissons alcoolisées consommées par l'Homme (10%), l'accès à l'alcool est limité à quatre heures par jour maximum et les souris ont un accès illimité à de l'eau.

Le stress chronique entraîne de facto un certain niveau de souffrance chez les souris. Notre équipe est spécialisée dans l'étude du stress et les manipulateurs et manipulatrices sont donc formé(e)s pour reconnaître le niveau de souffrance des animaux. Grâce à une surveillance accrue, nous adapterons le protocole pour chaque souris afin de maintenir le stress des animaux au strict minimum nécessaire à l'obtention d'un modèle comportemental fiable. Une grille de score établi des points-limites précoces et adaptés qui définissent un niveau maximal de stress acceptable avant l'arrêt de l'expérience.

Nous nous contenterons ensuite de mesurer l'évolution de la préférence pour l'alcool des souris. Les mesures de l'activité des circuits neuronaux s'effectueront *in vitro*, une fois la souris sacrifiée.

Le deuxième objectif de ce projet sera de prendre le contrôle d'une structure du tronc cérébral dans le même modèle murin d'abus d'alcool suite à un stress. Nous tenterons de contrecarrer les effets du stress sur l'abus d'alcool en empêchant la mise en place des modifications de l'activité cérébrale observées dans le premier objectif.

Pour ce faire, les souris recevront une injection intracérébrale d'un vecteur viral apportant un « interrupteur biologique » qui nous permet de contrôler l'activité des structures de notre choix à la manière d'un bouton ON/OFF. L'injection intracérébrale s'effectue sous anesthésie générale et les souris disposent de trois semaines de convalescence sous surveillance accrue avant les tests. Le vecteur viral en lui-même, un « virus adénoassocié » est sans danger pour l'Homme comme pour les souris. Notamment, il ne provoque pas de maladies, n'altère pas l'ADN et ne peut pas se propager. L'interrupteur biologique n'a aucun effet en lui-même car il est constitutivement inactif. Nous l'activons à volonté par l'injection d'un composé inerte, la Clozapide-N-Oxide, par une simple injection intrapéritonéale. L'unique effet de ce système combiné est de modifier légèrement le niveau d'activité des structures cérébrales étudiées pendant quelques heures.

Afin d'étudier les circuits neuronaux de manière plus raffinée, nous utiliserons des lignées de souris transgéniques qui nous permettront de prendre le contrôle de sous-groupes de neurones spécifiques. Les modifications génétiques de ces souris n'apportent aucun phénotype dommageable, elles servent uniquement à l'expression d'un marqueur permettant de localiser les neurones d'intérêt.

Ce projet nous permettra de mieux comprendre comment le stress interagit avec les troubles de l'abus d'alcool dans le cerveau. Il nous permettra également de tester une nouvelle cible potentielle dans le traitement de ces pathologies dans l'optique de permettre le développement futur de thérapies et méthodes préventives innovantes basées sur la régulation des circuits cérébraux.

L'ensemble du projet nécessitera un maximum de 1308 souris adultes. Les procédures présentées dans ce projet ont été pensées afin de prendre en compte les objectifs de la règle des 3R. Remplacement La souris est le modèle le plus adéquat pour cette étude car la complexité des structures et circuits cérébraux dérégulés par le stress et l'alcool chez l'Homme est conservée chez la souris. Réduction Nous utiliserons le moins d'animaux possibles grâce à des prévisions statistiques de la taille minimale nécessaire à chaque expérience. Les animaux ne seront engagés dans les expériences que si leur intérêt scientifique est confirmé par les résultats déjà obtenus. Raffinement Les animaux seront hébergés dans un environnement adapté et contrôlé (enrichissement, température, nourriture, etc.) et leur bien-être sera suivi quotidiennement, notamment via la grille de score en annexe, qui définit des points-limites précoces et adaptés.

14544 Les études épidémiologiques montrent une relation positive entre consommation de viande rouge et de charcuteries et le développement du cancer colorectal. Les recommandations de diminution de consommation de ces produits ne sont pas suivies par environ un tiers de la population française. Il est donc nécessaire de comprendre les mécanismes impliqués pour proposer des stratégies préventives alternatives à la diminution de consommation. Nos travaux précédents ont montré que la consommation de viande rouge provoque, via sa richesse en fer héminique qui donne sa couleur à cette viande, la formation de composés toxiques appelés aldéhydes dans le tube digestif. Ce mécanisme est proposé pour expliquer le risque accru de développer un cancer du côlon associé à la consommation de viande rouge et de charcuteries. Nous avons également montré que la consommation de fer héminique, présent dans la viande rouge, modifiait la composition de la flore intestinale et qu'un régime riche en antioxydants pouvait en limiter les effets néfastes. Ce projet vise à identifier l'ensemble des composés potentiellement toxiques formés lors de la consommation de viande rouge, évaluer leur impact sur la flore intestinale et étudier l'effet d'une supplémentation en antioxydants sur leur formation. Nous allons évaluer l'effet de régimes riches en viande rouge, comprenant des acides gras oméga-6 ou oméga-3, comparé à un régime riche en viande blanche et supplémenté en antioxydants (vitamines C et E) sur plusieurs paramètres en lien avec le cancer colorectal. Ces travaux nous permettront notamment d'évaluer l'effet bénéfique ou au contraire néfaste de la viande et des autres composants du régime (graisses, antioxydants). Nous proposons une expérimentation nutritionnelle de 21 jours chez 90 rats mâles. Pour cette procédure, 9 groupes seront constitués afin de suivre les biomarqueurs fécaux et urinaires de l'effet promoteur de la viande rouge (formation d'aldéhydes et toxicité des contenus colique), la composition de la flore intestinale et l'expression de gènes en lien avec le cancer au niveau du côlon. Cette expérimentation sans prélèvement invasif sur les animaux sera conduite dans le cadre de la règle des trois R le nombre des animaux est réduit au maximum en gardant toutefois une puissance statistique suffisante. Les conditions expérimentales n'engendrent pas de douleur particulière. Les rats seront hébergés dans des locaux d'animalerie conventionnels, en cage collective, leur assurant les meilleures conditions de vie. L'utilisation de modèle animal est indispensable car aucune étude *in vitro* ne permet l'évaluation complète de l'effet du fer héminique au sein de l'écosystème colique, qui comprend plusieurs types cellulaires, la présence de la flore intestinale, et des interactions neurologiques et immunitaires avec l'ensemble de l'organisme, tout en mimant la digestion.

14545 -Le diabète, qui touche plus de 400 millions de patients dans le monde, est la première cause de cécité par atteinte de la rétine (rétinopathie), des reins (néphropathie), des nerfs (neuropathie) et de plaies cutanées chroniques. Toutes ces complications ont été reliées à une atteinte des petits vaisseaux sanguins liés à l'hyperglycémie. On parle de microangiopathie diabétique.

-Le diabète est également associé à la fragilité osseuse avec un risque de fracture 3 à 5 fois plus élevé chez les diabétiques de type 1 (T1D), les fractures survenant 10 à 15 ans plus tôt que dans la population générale.

Or, un certain nombre d'études a fait état de corrélations entre l'augmentation du taux de fractures et l'atteinte vasculaire (microangiopathie) liée au diabète. Cependant, bien que l'os soit irrigué par un réseau vasculaire dense, nous ne savons pas si l'ostéoporose diabétique, maintenant appelée " diabétoporose " est une maladie microvasculaire qui, d'une part, pourrait être une cible thérapeutique et d'autre part, pourrait avoir un impact sur la réponse osseuse aux traitements ostéonabolisants (traitements visant à favoriser la formation osseuse).

L'objet de notre étude est donc d'évaluer la microvascularisation osseuse chez des souris rendues diabétiques et de comparer ces données à celles recueillies sur des souris saines.

Les paramètres osseux seront évalués *in vivo* (microtomographie par scanner) et *ex vivo* (histologie : étude du tissu)

Le réseau vasculaire osseux sera étudié dans ses aspects structurels (immunohistochimie *ex vivo*), mais également fonctionnels (mesure de perfusion osseuse au niveau du tibia, évaluation de la perméabilité des vaisseaux en microscopie intravitale sur les os du crâne).

Afin de mener à bien ce projet, 119 souris C57Bl6/j mâles adultes, matures sur le plan squelettique, seront nécessaires.

Ce nombre ne peut-être diminué sans risque de mettre en péril l'interprétation statistique.

Lors de la réalisation de cette étude, chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité, par du personnel qualifié, pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. La douleur est rigoureusement contrôlée grâce à des points limites évalués en amont, et gérés grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (myorelaxant/anesthésie/analgésie). Les animaux sont hébergés en groupes harmonieux (par 2), dans un environnement enrichi (copeaux, matériel de nidification, bâtonnets à ronger) dans une salle aménagée pour diminuer le stress et atténuer les bruits environnementaux. Eau et nourriture sont mises à disposition "ad libitum".

14546 Le syndrome de Netherton (SN) est une maladie génétique cutanée rare dont l'incidence est estimée à 1/200000. Il est caractérisé par une érythrodermie ichtyosiforme congénitale (dermatose inflammatoire génétique), une anomalie capillaire et des manifestations atopiques (allergiques). Ces symptômes sont présents dès la naissance, entraînant des infections bactériennes, une déshydratation, une hypothermie et une perte de poids extrême et sont à l'origine d'un taux de mortalité postnatal élevé. Ces symptômes conduisent à une inflammation sévère de la peau évoluant par poussées ayant un fort impact sur la qualité de vie des personnes atteintes. Jusqu'à présent, il n'existe pas de traitement efficace pour les sujets atteints du SN.

Dans de précédentes études nous avons développé et caractérisé des modèles murins génétiquement modifiés et inductibles au tamoxifène, mimant le plus fidèlement possible les symptômes du SN. L'étude de ces modèles a permis d'identifier une molécule majeure de l'inflammation. L'objectif de ce projet est de valider l'importance de cette molécule dans la physiopathologie du SN et tester l'efficacité d'une molécule thérapeutique *in vivo* qui a été préalablement validées *in vitro*.

Afin de vérifier l'importance de cette molécule inflammatoire dans la physiopathologie du SN, nous croiserons nos modèles murins avec des souris délétées du gène codant pour la molécule d'intérêt. Pour confirmer le rôle de cette molécule et envisager une solution thérapeutique, nous injecterons en intrapéritoneale un anticorps bloquant dirigé contre la molécule d'intérêt dans nos modèles murins du SN. Cet anticorps bloquant a été préalablement testé et optimisé *in vitro* afin de réduire au maximum le nombre d'animaux pour cette étude.

Ce projet est développé dans le respect de la règle des 3R, un nombre minimal d'animaux sera donc utilisé. Dans ce projet, un total de 180 souris est estimé pour une durée de 5 ans. Il s'agit du nombre d'animaux jugé nécessaire pour obtenir des résultats analysables, en incluant les répétitions indispensables à la démonstration. Afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, les procédures se dérouleront avec une surveillance journalière et une prise en charge de la douleur sera pratiquée si nécessaire. De plus, un enrichissement du milieu sera effectué par l'ajout de maisonnettes en cartons, de coton pour la nidification et de bâtonnets en bois à ronger. Des points limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

A terme, les résultats précliniques de ce projet permettront de mieux comprendre la physiopathologie du SN et de développer une nouvelle thérapie ayant le potentiel d'améliorer la prise en charge thérapeutique des patients

14547 Les syndromes myéloprolifératifs (SMP) sont des maladies caractérisées par une production excessive de cellules sanguines due à une série de mutations génétiques parmi lesquelles la plus fréquente est la mutation du gène JAK2 V617F.

Les inhibiteurs de JAK1/2 (JAKi), et principalement le ruxolitinib, jouent un rôle clé dans la prise en charge de la myélofibrose (MF) et de la polyglobulie de vaquez (PV) depuis l'obtention de leur AMM en 2012 et 2015 respectivement. Ces JAKi améliorent la symptomatologie des patients liée à l'activation de la voie JAK/STAT, mais leurs effets à long terme restent encore peu explorés.

Quelques cas de carcinomes cutanés agressifs ont été rapportés dans la littérature et un excès de tumeurs cutanées non-mélanomateuses a été observé dans un essai clinique.

Grâce à un recueil de données -clinique et histologique- exhaustif sur une cohorte de 1007 patients, il a été mis en évidence une fréquence accrue de carcinomes épidermoïdes agressifs chez les patients traités par ruxolitinib comparativement aux patients non traités.

L'hypothèse principale sous-jacente à cet effet pro-tumoral est l'immunosuppression induite par l'inhibition de la voie JAK/STAT. De nombreuses publications ont décrits des modèles de culture en trois dimensions permettant de mimer l'interaction derme – épiderme *in vitro* pour l'étude du développement tumoral cutané. Cependant, ces cultures organotypiques, d'une part ne récapitulent pas toute la complexité de l'organe, et d'autre part ne permettent pas d'explorer l'effet immuno-modulateur des inhibiteurs de JAK. Les modèles *in vitro* ne peuvent donc pas remplacer l'étude *in vivo*, c'est pourquoi nous aurons recours à des animaux pour valider notre hypothèse.

L'objectif principal de ce projet est d'évaluer *in vivo* l'effet du ruxolitinib dans un modèle de carcinome cutané induit chimiquement.

Nous utiliserons le modèle d'induction de carcinome cutané déjà décrit dans la littérature. Des souris normales seront traitées avec des molécules chimiques (application sur la peau du dos à J0 et J42 pour l'une des molécules et à semaine 2, 6, 9 et 40 pour la seconde) Les souris seront traitées avec le ruxolitinib à partir de la semaine 8, soit juste avant l'apparition des premiers papillomes pré-cancéreux et jusqu'à la semaine 20, soit après l'apparition des premiers carcinomes. Le traitement s'effectuera par gavage oral à l'aide de sonde en plastique sur souris éveillées.

Afin d'obtenir des données statistiquement exploitables, nous utiliserons des groupes de 12 souris (1 lot contrôle et 1 lot traité par le ruxolitinib). L'expérience sera reproduite 2 fois de manière indépendante afin de s'assurer de la pertinence des résultats obtenus. Nous utiliserons donc 48 souris pour ce projet, sur une durée de 2 ans.

Le suivi des animaux sera quotidien et effectué dans le respect du bien-être animal. Il sera assuré grâce à une fiche de score qui permettra de surveiller l'état des animaux. Les souris seront sacrifiées au plus tard 40 semaines après l'administration des molécules induisant la tumeur ou plus tôt si un animal présente une souffrance.

14548 La maladie d'Alzheimer est une priorité médicale majeure pour laquelle aucune thérapie efficace n'existe aujourd'hui. La mise au point d'un médicament neuroprotecteur, préservant l'intégrité des neurones et ralentissant l'avancée de la pathologie neurodégénérative serait un progrès médical majeur. Nous analysons les effets neuroprotecteurs d'une nouvelle série de molécules agissant comme inhibiteurs de la butyrylcholinestérase, un enzyme jouant un rôle dans la neurotransmission cholinergique, très atteinte dans la pathologie et dans les dépôts de protéine amyloïde- β , l'un des processus pathologiques de la maladie. Les composés sont synthétisés par un groupe de chimiste et sélectionnés sur leurs propriétés physicochimiques pour être testés *in vivo*. La pathologie sera induite par injection de peptide A β chez des souris Swiss males anesthésiées. Les capacités cognitives des animaux seront analysées par des tests de comportement classiques en neuropharmacologie. Puis les souris seront sacrifiées, leur cerveau prélevé pour des analyses biochimiques de marqueurs de toxicité. Ce projet vise à sélectionner un composé efficace prévenant l'apparition des troubles de mémoire, premier signe de la maladie d'Alzheimer. Pour respecter la règle des 3R, un maximum de 3 doses sera testé par composé et le nombre d'animaux par groupe est limité à ce qui doit permettre d'obtenir des analyses statistiques fiables. L'utilisation du modèle animal reste nécessaire, la finalité de l'étude concernant les troubles cognitifs liés à la maladie d'Alzheimer. Mais le plan expérimental ainsi que les méthodes statistiques utilisées permettent d'optimiser le nombre total d'animaux. Pour un composé, le plan expérimental nécessitera 40 souris, les animaux des groupes contrôles étant poolés pour permettre une comparaison directe des composés. Le projet repose sur l'analyse de 12 molécules, soit 4 composés sélectionnés issus de trois séries chimiques différentes et utilisera donc un total de 480 souris. Les méthodes d'enrichissement ne pourront être appliquées dans ce projet, dans la mesure où il a été montré qu'elles interfèrent fortement avec le comportement cognitif des animaux. Une surveillance

quotidienne sera assurée lors de tous les protocoles afin de détecter très rapidement tout signe de morbidité et de procéder à l'arrêt du traitement (Raffinement).

14549 La maladie de Parkinson touche plus de 200000 personnes en France. Comme pour toutes les maladies neurodégénératives, ce nombre risque d'augmenter de façon importante dans les années à venir, du fait du vieillissement général des populations, ce qui va imposer un coût considérable pour la société, aussi bien pour la prise en charge des patients que pour leurs proches aidants. L'origine de cette maladie est multifactorielle et reste encore mal comprise, car elle combine des facteurs génétiques et environnementaux. On sait cependant qu'elle conduit à la perte des neurones produisant un neurotransmetteur, la dopamine, qui sont localisés au niveau de la substance noire du cerveau et qui sont impliqués dans le contrôle des mouvements. Même si certains traitements permettent de ralentir l'évolution de la maladie, ils restent encore d'une efficacité modérée et sont parfois très invasifs, comme une implantation neurochirurgicale d'électrodes pour une stimulation cérébrale profonde. Il est donc essentiel d'identifier de nouvelles pistes thérapeutiques pour cette maladie.

Dans ce projet, nous souhaitons tester le potentiel thérapeutique de nouveaux composés en utilisant un modèle chronique de la maladie de Parkinson induit chez la souris. Nous utiliserons des souris chez lesquelles nous exprimerons une forme mutée d'une protéine humaine, la synucléine, dans le cerveau. Cette protéine mutée a été associée à certaines formes de la maladie de Parkinson chez l'Homme. Ce modèle permet de mimer la maladie humaine de façon assez progressive, sur quelques semaines et d'évaluer ainsi l'efficacité de traitements sur l'évolution de la maladie. Nous proposons un traitement par instillation nasale des composés, qui permettrait à terme d'offrir une alternative simple et peu invasive aux patients.

Le recours au modèle animal est donc irremplaçable pour notre étude, puisqu'il vise à évaluer l'impact d'un traitement par voie intranasale sur de nombreux paramètres neuronaux (perte neuronale, inflammation).

Il est prévu d'utiliser un maximum de 700 souris sur 5 ans, à raison de 20 lots de 35 souris par lot.

La règle des 3R sera appliquée pour ce projet comme suit

1- Remplacement le recours à l'expérimentation animale se produit après avoir démontré le potentiel de nos composés sur des modèles de cultures neuronales *in vitro*. Il devient donc essentiel pour évaluer leur efficacité après administration par voie intranasale sur une maladie chronique, dépendante de multiples facteurs. Le principe de remplacement n'est donc plus applicable pour ce projet, car les études *in vitro* ne permettent pas de mimer l'accès au cerveau par voie intranasale.

2- Réduction les expériences sont planifiées de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux, tout en permettant une analyse statistique valide des résultats. Des études préliminaires ont établi que des groupes de 5 animaux par condition permettaient d'obtenir des résultats exploitables. En outre, chaque animal n'étant injecté que dans un seul hémisphère cérébral par la protéine mutante, il est donc son propre contrôle (par comparaison entre les côtés injecté et non injecté).

3- Raffinement les conditions d'expérimentations font l'objet d'une procédure de suivi du bien-être animal, qui sera en permanence au centre de nos préoccupations. Les souris sont hébergées en groupes. Du coton ou des abris sont ajoutés dans les cages pour permettre la nidification. Les animaux ont une semaine d'acclimatation avant que le protocole ne débute. Les animaux sont suivis quotidiennement. Un animal sera euthanasié s'il présente un des points limites d'arrêt de la procédure définis à partir d'une perte de poids de plus de 20% du poids initial, déshydratation, ou prostration continue, que nous aurons déterminé en accord avec le comité de suivi du bien-être animal de notre établissement utilisateur pour limiter la douleur, la souffrance ou l'angoisse de l'animal. Afin de limiter la douleur liée aux procédures expérimentales de chirurgie, celles-ci seront réalisées sous anesthésie générale et utilisation d'analgésiques. Pour les procédures sévères, tous les documents seront disponibles pour une évaluation rétrospective éventuelle.

14550 L'asthme est une maladie très fréquente des voies respiratoires. On estime qu'environ 100 à 150 millions de personnes dans le monde souffrent d'asthme, avec des incidences variables selon les pays. L'asthme est caractérisé par une hyperréactivité, une inflammation et un remodelage bronchique. Les modifications structurales, que l'on désigne par remodelage bronchique, incluent entre autre une augmentation de la taille du muscle lisse bronchique (MLB).

L'augmentation de MBL aggrave les signes cliniques de l'asthme.

Les travaux *in vitro* et *in vivo* de notre laboratoire ont mis en évidence un lien entre la taille de MLB et l'augmentation de la quantité des mitochondries des cellules du muscle lisse (CML) bronchique. Ces résultats démontrent la présence d'un dysfonctionnement mitochondriale au sein du MLB chez les patients asthmatiques.

Notre stratégie est d'essayer de réduire l'expression des gènes impliqués dans la formation des mitochondries, comme, par exemple, le gène TFAM. Afin de diminuer l'expression d'un gène d'intérêt dans les CML bronchiques, nous allons injecter un produit qui permettra l'excision du gène d'intérêt.

La présente étude-pilote a pour but de mettre au point la procédure d'excision d'un gène dans les muscles lisses bronchiques suite à l'utilisation de ce produit le tamoxifène. Les résultats ainsi obtenus sur la lignée test nous permettront en future d'exciser des gènes d'intérêt dans les CML bronchiques dans le modèle murin de l'asthme chronique allergique.

Dans notre recherche, nous accordons la plus grande importance au respect de la règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer). Les mesures mises en place sont les suivantes

1) Réduire se souciant de réduire le nombre des animaux en expérimentation, nous avons calculé le nombre de souris minimal par groupe pour obtenir des résultats significatifs, et nous réaliserons de multiples études *ex vivo* sur différents organes et selon différentes techniques. 2) Raffiner pour diminuer la souffrance et l'angoisse des animaux, des dispositifs sont prévus (anesthésie pour la prise d'image *in vivo*, raffinement des conditions d'hébergement, vérification par la structure du bien-être animal). 3) Remplacer En raison de la complexité de la communication intercellulaire menant à la maladie, il n'existe pas de modèle *in vitro* qui permet d'estimer l'évolution du remodelage bronchique dans l'asthme suite au blocage du gène clé de la biogénèse mitochondriale. L'utilisation du modèle d'asthme chroniques murin dans nos études nous donnera une meilleure compréhension des phénomènes. Notre projet nécessite l'utilisation de 50 animaux.

14551 Le système immunitaire nous défend contre les infections et les tumeurs. Son activité doit être finement contrôlée afin de favoriser l'élimination des pathogènes ou des cellules cancéreuses tout en prévenant le développement des immuno-pathologies, provoquées par une activation exacerbée ou inappropriée du système immunitaire comme dans le cas de l'asthme allergique.

L'asthme est une inflammation chronique pulmonaire affectant environ 10% de la population mondiale dont l'incidence a fortement augmenté depuis plus de 30 ans dans les pays industrialisés. Les traitements disponibles sont pour le moment uniquement symptomatiques. Il s'agit d'une pathologie impliquant de façon critique une sous-population de lymphocytes T. Nous cherchons à comprendre comment mieux contrôler ces lymphocytes T en testant l'effet de nouvelles molécules chimiques sur un modèle d'asthme allergique chez la souris.

Dès que possible nous remplaçons l'expérimentation sur la souris en ayant recours à des approches d'étude *in vitro*. Ces expériences nous permettent de bien cibler et ainsi de raffiner nos analyses *in vivo*, essentielles pour étudier la relevance physiologique de nos résultats. Cette approche combinée permet de réduire de façon importante le nombre d'animaux utilisés dans nos nombreux projets de recherche, qui se limitera ainsi à 56 souris sur quelques semaines. Dans toutes nos expériences, nous suivons très fréquemment l'état de santé de nos souris par observation de leur comportement. En cas de signes externes de souffrance (cachexie, prostration, hypothermie, poils hérissés) persistants plus de 24h les animaux sont euthanasiés. Nous déterminons également fréquemment le poids de nos souris qui seront euthanasiées quand elles auront perdu plus que 20% de leur poids au début de l'expérience. Dans nos expériences sur les pathologies immunitaires, nous déterminons des indicateurs de la maladie dans l'urine, le sang, ou encore d'autres et

euthanasions nos animaux quand certaines limites ont été atteintes. La grande expérience de notre laboratoire dans ce domaine, documenté dans la meilleure littérature scientifique internationale, nous permet de limiter ainsi la souffrance de nos souris au strict minimum et de l'éviter si possible.

L'ensemble des projets de notre équipe, impliquant de l'expérimentation *in vitro*, des modèles animaux ainsi que des échantillons issus de patients, permettra de mieux comprendre le contrôle des réponses immunitaires et ainsi de développer de nouvelles thérapies contre des pathologies très sévères chez l'homme.

14552 La broncho-pneumopathie chronique obstructive, également appelée BPCO, constitue un groupe de maladies respiratoires chroniques pour lesquelles il n'y a pas de traitement curatif à l'heure actuelle. Cette maladie essentiellement liée au tabagisme est mal connue du grand public même si elle est actuellement la 5ème cause de mortalité dans le monde. Selon des données de l'OMS, elle deviendra la 3ème cause de décès à l'horizon 2020 et représente donc un défi majeur de santé publique au cours des prochaines années. Dans une optique de traitement de la BPCO, un des partenaires de ce projet a développé un biomédicament ciblant spécifiquement les protéases de neutrophiles dont on sait qu'elles sont fortement impliquées dans la dégradation du tissu pulmonaire et dans l'inflammation chronique observée dans la BPCO.

L'objectif de ce projet est de réaliser

-une étude de biodistribution *in vivo* de ce biomédicament, par imagerie scintigraphique, selon 2 voies d'administration (intra nasale et inhalation pulmonaire) dans un modèle d'inflammation pulmonaire au LPS. Cette phase nécessitera 36 souris.

-une preuve de concept de l'efficacité thérapeutique de ce biomédicament par imagerie de bioluminescence dans un modèle d'infection pulmonaire à *Pseudomonas aeruginosae*, bactérie impliquée dans les infections pulmonaires chez l'homme. Cette phase nécessitera 30 souris supplémentaires.

Ces travaux seront réalisés sur des souris modèles d'inflammation et d'infection pulmonaire. Les dommages attendus sont liés au développement d'une inflammation ou d'une infection pulmonaire. La définition de points limites appropriés nous permettra de statuer et d'anticiper toute souffrance induite chez les animaux.

Ce projet nécessitera 66 souris.

Ce projet qui mettra en œuvre des approches par imagerie *in vivo* sera réalisé en respectant la règle des 3R Raffinement les animaux seront étudiés par imagerie *in vivo* non invasive, pratiquée sous anesthésie générale, ce qui n'induit pas de douleur et permet de réduire le stress infligé au cours de l'expérimentation. Réduction la mise en oeuvre de l'imagerie permet de réaliser un suivi longitudinal des animaux et ainsi de réduire le nombre d'animaux nécessaires à l'obtention de données exploitables. Remplacement les informations attendues ne peuvent pas être obtenues *in vitro* car à ce jour l'animal de laboratoire reste le seul recours permettant d'étudier la composante inflammatoire ou infectieuse en tenant compte de la complexité de la physiologie d'un organisme vivant.

14553 Les maladies génétiques affectant l'épithélium pigmentaire rétinien entraînent des pertes sévères et rapides de la vision conduisant à la cécité et touchent des millions de personnes dans le monde. Alors que la dégénérescence maculaire liée à l'âge, qui représente la forme la plus commune de cécité dans les pays occidentaux, semble déclenchée par des causes environnementales et génétiques, les rétinites pigmentaires sont dans la plupart des cas d'origine monogénique et affectent des populations plus jeunes. En France, environ 1,5 million de personnes seraient atteintes de dégénérescence maculaire et 200 000 de rétinites pigmentaires.

Une des causes de rétinites pigmentaires et dégénérescence maculaire peut être la perte des photorécepteurs, due à un dysfonctionnement ou à la dégénérescence de cet épithélium pigmentaire rétinien. Jusqu'à présent aucun traitement n'est disponible pour ces pathologies. La thérapie génique, qui pourrait rétablir certaines fonctions des cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien, est rendue difficile par l'hétérogénéité des mutations génétiques en causes dans l'altération

des photorécepteurs. Nous proposons donc une approche cellulaire consistant à greffer un épithélium pigmentaire rétinien sain dérivé de cellules souches.

Notre étude est proposée dans le cadre de l'évaluation de la sécurité d'un produit de thérapie cellulaire composé de cellules d'épithélium pigmentaire rétinien dérivées de cellules souches embryonnaires humaines, et d'une membrane amniotique humaine servant de support. Ce produit de thérapie cellulaire sera greffé dans l'espace sous-rétinien de primates non humain. Les actes chirurgicaux se feront sous anesthésie générale, et la douleur peropératoire sera gérée par l'administration d'analgésiques. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions et des critères de points limites sont prévus pour prendre en compte des effets inattendus qui engendreraient une souffrance de l'animal pour laquelle les traitements classiques (antalgiques, analgésiques) n'auraient pas d'effet. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement s'il y a des signes de souffrance et de veiller au bien-être des animaux. Dans ce cas, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider d'une euthanasie.

Une première phase de ce projet consistera à valider la technique chirurgicale, la deuxième partie sera consacrée à l'étude de l'innocuité du produit.

Le modèle expérimental *in vivo* est indispensable pour mener notre étude car aucun système *in vitro* ne peut mimer l'implantation de l'épithélium pigmentaire rétinien issu de cellules souches. Pour ce projet, nous utiliserons des primates non-humain, seule espèce ayant des propriétés anatomiques similaires à l'Homme au niveau de l'anatomie de l'œil et notamment de la rétine. Ce projet s'appuie sur des études préalables *in vitro* et chez le rongeur. Le nombre d'animaux (12 adultes au maximum sur 5 ans) a été réduit au minimum nécessaire pour obtenir des données statistiquement significatives, et chaque animal est utilisé pour l'ensemble des étapes du projet, de l'implantation intraoculaire au prélèvement des tissus d'intérêt pour l'analyse. La technique chirurgicale sera validée dans un premier temps à la faveur d'euthanasies faites pour d'autres études afin de limiter le nombre d'animaux utilisés. Les animaux seront nés en captivité et proviendront d'élevages agréés à des fins scientifiques. Ils seront hébergés en groupe, dans des conditions enrichies en favorisant les interactions sociales. La mise en œuvre d'un suivi longitudinal par imagerie *in vivo* sur les animaux anesthésiés minimise le nombre d'animaux utilisés ainsi que la contrainte qui leur est imposée.

14554 La douleur articulaire chronique est un problème de santé public majeur représentant un fardeau économique important pour la société. Une enquête récente de l'Inserm rapporte que 93% des Français ont déjà souffert de douleurs articulaires, dont la moitié en souffrait au moment de l'enquête. En outre, le soulagement de ce type de douleur reste insuffisant par les analgésiques actuels, ce qui est principalement dû à un manque de compréhension de la physiopathologie associée. Nos données préliminaires suggèrent un rôle important des canaux Acid-Sensing Channel (ASICs) dans ce type particulier de douleur via leur activation par certains lipides retrouvés dans le liquide synovial de patients. Nous cherchons maintenant à déchiffrer les mécanismes moléculaires par lesquels ces canaux ASICs contribuent à la douleur articulaire chronique via leur activation par certains lipides. Deux objectifs sont poursuivis dans cette étude. Dans un premier temps nous caractériserons et validerons au niveau du comportement douloureux et de l'anxiété associée un nouveau modèle d'arthrite induite par l'administration intraarticulaire de lysophosphatidylcholine (lipide identifié dans le liquide synovial de patients souffrant de douleurs articulaires, modèle LPC). Ce modèle sera comparé à un modèle d'arthrite inflammatoire induite par l'administration de CFA. En effet, ces deux modèles d'étiologie différente (modèle non inflammatoire à priori vs modèle inflammatoire) pourraient présenter des comportements et des mécanismes physiopathologiques différents. Le second objectif suite à cette validation sera d'étudier le rôle des canaux ASIC1a au niveau du noyau basolatéral de l'amygdale dans la douleur et l'anxiété associée dans notre nouveau modèle de douleur articulaire induite par le LPC. Dans un souci de respect de la règle des 3R, le nombre d'animaux utilisés (n=170) a été réduit à son minimum, les conditions d'hébergement, de procédures expérimentales et de suivi des animaux ont été optimisés afin de diminuer à son maximum la souffrance des animaux par l'utilisation de points

limites adaptés et de traitement antalgique lorsque cela est nécessaire. Enfin, le modèle LPC pourrait constituer un nouveau modèle d'étude de la douleur articulaire cliniquement très pertinent : son étiologie découlant directement de l'identification d'un lipide, le LPC, chez des patients souffrant de douleur articulaire

La force de ce projet est de combiner l'analyse d'échantillons humains, c'est-à-dire de lipides identifiés dans des exsudats de patients souffrant de différents troubles articulaires douloureux activant des ASICs, avec des études neurophysiologiques chez les rongeurs pour mieux comprendre la physiopathologie des douleurs articulaires. Il s'appuie sur l'expertise complémentaire de quatre équipes comprenant des rhumatologues, des spécialistes de l'analyse des lipides, des spécialistes des canaux ioniques et de la douleur, pour définir de nouvelles stratégies thérapeutiques pour lutter contre les douleurs articulaires chroniques, pour lesquelles il existe un manque évident de traitements efficaces.

14555 L'idée de ce projet est de supprimer, pour une pathologie donnée, l'agent (souvent une protéine) responsable de la pathologie en question et donc par conséquent stopper la maladie.

Nous avons choisi dans ce premier temps trois maladies qui touchent des milliers de personnes et pour lesquelles il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement curatif le cancer métastatique, la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson.

En effet, l'Organisation Mondiale de la Santé rappelle que le cancer tue chaque année 7.6 millions de personnes dans le monde et représente à lui seul 13% de la mortalité mondiale. Les métastases étant la principale cause de décès par cancer, mettre au point une thérapie préventive capable d'empêcher l'apparition de métastases chez l'Homme serait donc une avancée fondamentale.

Pour la maladie d'Alzheimer, maladie neurodégénérative touchant plus de 900 000 personnes en France, nous savons que le cerveau des patients atteints porte des dépôts amyloïdes associés à une protéine. La piste la plus explorée actuellement pour développer un traitement contre la maladie d'Alzheimer est l'immunothérapie qui consiste à éliminer cette protéine.

Quant à la maladie de Parkinson qui touche plus de 200 000 personnes en France, il s'agit d'une neuro-dégénérescence associée à la présence d'amas pathogènes formés par une protéine naturellement présente chez les sujets sains, mais retrouvée au sein de ces amas pathogènes sous une forme "malade". Et il a récemment été montré que cette protéine "malade" porte l'information nécessaire et suffisante à déclencher la maladie.

Notre projet prend donc toute son importance puisque nous proposons un traitement composé d'une protéine recombinante administrée par injection intra musculaire dans le but de diminuer le taux de protéine d'intérêt. Les traitements seront ici effectués sur des souris sauvages donc saines, afin d'analyser le bilan protéique résultant de ce traitement.

Notre stratégie pourrait donc contribuer à améliorer la santé humaine, d'autant plus qu'elle existe déjà chez l'Homme dans les traitements antirejet de greffe, qu'elle est sans dommage pour l'organisme et qu'elle est peu coûteuse.

Notre étude sera réalisée dans le respect de la règle des 3 R

- Remplacement cette étude nous contraint à utiliser des animaux car même s'il existe des modèles de cellules *in vitro*, celles-ci ne permettent pas d'obtenir une réponse immunitaire intégrée et adaptative, sujet de notre étude.

- Réduction nous utiliserons le test statistique des séries appariées pour calculer le juste nombre d'animaux qui sera de 60 souris pour l'ensemble de notre projet. Nos souris contrôle/témoin seront nos souris avant traitement.

- Raffinement pour les ponctions sanguines nous privilégierons le prélèvement au niveau de la veine sous maxillaire en sorte que le prélèvement soit le moins douloureux possible. Et l'électrotransfert se fera sous anesthésie générale par injection d'un mélange de kétamine/xylazine (86 mg/kg 10 mg/kg)

14556 La France a connu entre 2016 et 2017 deux crises sanitaires des filières avicoles liées aux virus influenza aviaires (VIA) ce qui soulève la nécessité d'une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la diffusion de ces virus et des facteurs modulant leur pathogénicité chez les espèces de cette filière. Notre projet a pour objectif de déterminer les caractéristiques de VIA importantes pour leur virulence dans un modèle d'infection et de caractériser leur transmission par contact direct et indirect. Les procédures expérimentales utilisées permettront de préciser et quantifier 1) les signes cliniques et lésions liés à l'infection 2) la cinétique de l'infection par le virus, le profil et la durée de l'excrétion du virus, la multiplication du virus dans les tissus cibles de l'infection et l'induction d'une réponse immunitaire chez l'animal et 3) et la transmission du virus entre animaux infectés et réceptifs.

Pour chaque VIA étudié, la première procédure expérimentale, permettant de caractériser la pathogénicité, comprend 2 groupes de 21 animaux le premier étant le groupe de 6 animaux témoins inoculés avec un placebo et le second groupe de 15 animaux inoculés, mis à mort à 3 temps différents dans les 10 premiers jours d'infection. La seconde procédure visant à étudier la transmission virale comprend 20 animaux répartis en deux groupes avec 2 sujets infectés par voie oculaire et de 18 sujets mis au contact des précédents 24 heures après infection qui sont mis à mort 21 jours post-inoculation.

Les animaux sont hébergés en animalerie après l'étape d'inoculation par le virus, le confinement des animaux devenant nécessaire pour des raisons de sûreté de manipulation des animaux infectés et de maintien de comparabilité entre les procédures pour chaque virus étudié. Des observations cliniques quotidiennes, des prélèvements par écouvillonnage oro-pharyngé et cloacal et des prélèvements de sang seront effectués sur les animaux. Au total ce projet comprend 820 animaux (574 canards, 205 poulets et 41 dindes) durant les 5 ans du projet, ce qui correspond à la caractérisation de 20 virus influenza aviaires en pathogénicité (21 animaux) et transmission (20 animaux).

Les procédures sont conduites dans le respect de la règle des 3R. L'étude de la pathogénicité et l'étude de transmission ne peuvent être évaluées *in vitro* et ne peuvent se faire que sur des animaux sensibles à l'infection par le virus d'où la nécessité de mettre en place des tests *in vivo* sur une espèce cible sensible à l'infection. Le choix des espèces aviaires (poulet et/ou canard et/ou dinde) s'est porté sur des espèces d'intérêt majeur pour le contrôle de l'infection en élevage. Dans l'éventualité de signes cliniques provoqués par le virus occasionnant un mal-être chez l'animal, des points limites sont définis (impossibilité de s'alimenter ou de s'abreuver y compris après sollicitation sonore et visuelle perte de poids de plus de 20% sur une semaine) pour que les animaux soient mis à mort avant que la souffrance ait atteint un seuil non acceptable. Une observation quotidienne des animaux permet d'intervenir au plus vite si un point limite est rencontré. Afin de réduire le nombre d'animaux, celui-ci est le plus faible possible tout en permettant l'obtention de résultats statistiquement robustes et pour la procédure de transmission, les animaux sont contrôlés avant infection permettant de servir de lot témoin ce qui permet de diminuer le nombre d'animaux en supprimant le lot témoin. Pour raffiner, les animaux sont logés dans les animaleries dans des parcs délimités, en respectant les normes d'élevage et avec à disposition des enrichissements appropriés.

14557 La fibrillation atriale (FA) est la forme la plus fréquente des troubles du rythme cardiaque touchant 1 à 2 % de la population mondiale, 250 000 personnes supplémentaires chaque année en France. Son incidence augmentant avec l'âge, on estime que sa prévalence sera multipliée par 2,5 d'ici les 50 prochaines années du fait de l'allongement de la vie dans les pays industrialisés. Cette pathologie cardiaque représente donc un problème de santé publique majeur.

Elle est associée à un risque accru d'accidents vasculaires cérébraux, d'infarctus du myocarde et d'insuffisance cardiaque.

Le développement de FA est par ailleurs une complication post-opérative fréquente des chirurgies cardiaques (environ 35% des cas) et est associé à une augmentation de l'inflammation. La procalcitonine (PCT) est un biomarqueur médiateur de l'inflammation. Nos données récentes ont montré une augmentation significative du niveau de PCT circulante chez les patients développant une FA 2 et 3 jours après une chirurgie cardiaque (8 fois augmenté comparé aux prélèvements

avant chirurgie). Des expériences *in vitro* réalisées sur cardiomyocytes atriaux de cochons d'inde adultes ont montré un effet pro-arythmique de la PCT. La calcitonine (CT), issue du clivage enzymatique de la PCT, est quant à elle présumée anti-arythmique.

Dans ce contexte, l'objectif principal de ce projet de recherche est de mettre en évidence le rôle du système PCT/CT dans le déclenchement de la FA post-opérative et de définir son potentiel comme nouvelle cible thérapeutique.

Pour cela, des souris traitées avec la PCT ou la CT seront utilisées afin de définir le rôle de ces 2 protéines dans la FA post-chirurgicale.

La règle des 3R est mise en pratique dans le cadre de ce projet.

Le modèle murin (souris) permet d'étudier le rôle de ces protéines *in vivo*. Le REMPLACEMENT d'animaux n'est actuellement pas possible, en effet dans le cadre de notre projet il est nécessaire de pouvoir étudier l'effet de ces protéines sur les réponses physiologiques dans l'organisme entier. Il n'existe pas d'autre modèle permettant de remplacer l'utilisation d'animaux.

Dans le but de REDUIRE le nombre d'animaux utilisés, une première série d'expériences sera réalisée afin de déterminer la voie d'injection et la concentration la plus adéquate à utiliser pour la suite des expérimentations. Ainsi, le nombre d'animaux a été limité au maximum à 130 souris. Ce nombre reste nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement fiables et pertinents.

Le RAFFINEMENT du projet et le respect du bien-être animal reposent sur plusieurs mesures

- les animaux sont hébergés dans des locaux agréés et bénéficient de soins quotidiens dispensés par du personnel compétent et soucieux du bien-être animal.
- les animaux sont habitués au personnel animalier afin de limiter tout stress
- une surveillance vétérinaire quotidienne est assurée
- les animaux sont hébergés en groupes sociaux ce qui leur permet d'exprimer des comportements naturels
- ils disposent d'enrichissements adaptés (litière, nid de cellulose)
- des critères d'alerte précis sont surveillés; si l'animal présente un signe de souffrance, des mesures adaptées sont mises en place immédiatement par la vétérinaire responsable de l'animalerie en lien avec le responsable du projet.
- pour la procédure 2, seule procédure de ce protocole faisant intervenir une chirurgie, se déroulera sous anesthésie générale après injection locale d'un analgésique par voie sous-cutanée (lidocaïne hydrochloride 0,5%).

14558 Les anticorps sont générés par le système immunitaire chez l'homme ou les animaux en réponse à l'exposition à un immunogène (un immunogène est une molécule capable d'induire une réponse immunitaire) On les retrouve en quantité importante dans le sang.

Ils ont pour caractéristique de reconnaître spécifiquement l'immunogène contre lequel ils ont été générés et de s'y fixer.

Cette caractéristique fait des anticorps poly-clonaux un outil indispensable pour la détection et la quantification de molécules d'intérêt. C'est pourquoi ils ont de très nombreuses applications en recherche et sont utilisés dans de nombreuses techniques.

L'objectif de ce projet est la production d'anticorps poly-clonaux par des lapins new zealand white. Ces anticorps sont destinés à être utilisés dans des applications en recherche.

Le lapin new zealand white est l'animal de laboratoire le plus adapté au développement d'anticorps poly-clonaux pour la recherche. Il montre en effet une très bonne réponse immunitaire et permet de récolter une quantité de sang suffisante pour les applications en recherche.

Nous pouvons indifféremment utiliser les femelles et les mâles.

Dans le cadre de cette étude, une attention particulière sera portée au respect de la règle des 3R.

Le remplacement du modèle in-vivo ne peut être envisagé car la réponse immunitaire est un phénomène complexe impliquant la coopération entre de multiples types cellulaires, pour lequel il n'existe pas d'équivalent in-vitro.

Dans un objectif de réduction, nous n'utilisons que la quantité d'animaux strictement nécessaire à l'obtention de la quantité de sérum attendue.

Dans un objectif de raffinement, tous les actes réalisés le sont en conformité avec les bonnes pratiques en expérimentation animale et les recommandations édictées sur le sujet. De plus les lapins sont observés tous les jours

En fonction des demandes que nous recevons nous prévoyons d'utiliser jusqu'à 500 lapins par an, 2500 lapins sur 5 ans.

14559 De nombreuses molécules sont développées à des fins thérapeutiques, mais l'accès de ces molécules au cerveau et à leurs cibles au sein du tissu cérébral est encore très restreint. Cela pose des contraintes fortes pour le développement de traitements efficaces pour les maladies du cerveau. Notre projet vise à développer une méthode d'encapsulation qui permet la libération contrôlée dans le temps, l'espace et avec des concentrations précises de molécules. Pour cela, des microparticules ont été développées pour contenir des molécules en quantités contrôlées et pouvoir libérer leur contenu à la demande.

La présente demande d'autorisation constitue la première étape de ce grand projet, elle est destinée à durer 2 ans et à solliciter l'utilisation de 160 souris adultes mâles. Cette première étape consiste à injecter sous anesthésie dans le cerveau les particules développées dans le cadre de ce projet, sans molécule active, mais fluorescentes. Ainsi, les particules pourront être suivies dans le tissu cérébral, ainsi que dans les organes d'élimination de l'organisme, le foie et les reins. Pour cela, les particules seront injectées dans le cerveau de souris sous anesthésie et le suivi se fera de deux manières. D'une part, le parcours des particules dans l'organisme sera suivi dans le temps par un système d'imagerie à fluorescence chez l'animal anesthésié. Cette méthode permet un suivi dans le temps chez le même animal, mais possède une résolution faible. D'autre part, un autre groupe d'animaux sera analysé à différents temps, de quelques heures à quelques semaines après l'injection des particules dans le cerveau, afin d'analyser à l'échelle cellulaire le devenir des particules. La moitié de ce projet se fera avec des animaux suivis dans le temps (imagerie fluorescente), afin de limiter l'utilisation des souris.

Une première étape de ce projet va être effectuée sur des cellules en culture, en remplacement des animaux, afin d'évaluer l'innocuité des particules fluorescentes. Cependant, ce projet est fondamentalement un projet de physiologie intégrée, il est donc nécessaire d'utiliser des modèles animaux pour une partie de l'étude. En effet, nous souhaitons regarder le devenir des particules dans l'organisme, ce qui n'est pas compatible avec l'utilisation de cellules en culture. Par ailleurs, nous n'avons pas encore suffisamment de données pour utiliser des modèles informatiques. Enfin, notre projet de nouvelle technologie est trop préliminaire pour être effectué chez l'Homme.

Le nombre d'animaux estimés pour cette étude princeps est justifié par les différents temps post-chirurgie à analyser, afin d'avoir une cinétique suffisamment précise du devenir des particules lorsqu'elles sont injectées dans le cerveau. Pour tous les groupes, le nombre d'animaux est limité au strict nécessaire pour garantir la significativité. Les 160 animaux seront divisés en 4 groupes 2 groupes pour l'imagerie *in vivo* et 2 pour l'imagerie *ex vivo*. Pour chaque type d'imagerie, des injections dans le tissu cérébral seront comparées à des injections dans les ventricules cérébraux (poche de liquide dans le cerveau qui permet la communication entre le cerveau et la circulation sanguine/lymphatique de l'organisme). L'utilisation de l'imagerie *in vivo* dans ce projet est destinée à réduire le nombre d'animaux utilisés, puisqu'un même animal peut être observé à différents temps pour établir une cinétique. La durée du projet étant de 2 ans, cette étude représente l'utilisation de 80 animaux/an.

Les souris seront hébergées avec leurs congénères par groupes de 4 ou 5 dans des cages collectives, avec un accès libre à la nourriture et à l'eau. Les souris bénéficieront d'un enrichissement comportemental dans leurs cages. Elles seront surveillées tous les jours et pesées

toutes les semaines, pour s'assurer de leur bonne santé. Lors de la chirurgie, les souris seront sédaturées et recevront des anti-douleurs en plus de l'anesthésie gazeuse. Elles seront monitorées tous les jours pendant 3 jours après la chirurgie. Des critères d'arrêt basés sur le comportement général et la prise de poids seront strictement suivis, et si un animal présente un mal-être trop important, il sera euthanasié.

La première étape de ce projet innovant est indispensable afin d'apporter une preuve de concept en terme de faisabilité, d'efficacité et de non-toxicité de cette nouvelle approche. Cette étude préclinique a pour ambition à terme d'ouvrir la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques pour les maladies neurologiques, neuropsychiatriques et neurodégénératives.

14560 Les maladies de la rétine peuvent conduire à l'altération du champ visuel et à la perte de la vision. Ces maladies sont variées, liées au vieillissement comme la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA), génétiques comme les rétinites pigmentaires, complications du diabète ou consécutives à des traumatismes. Ces maladies entraînent une dégénérescence, une perte de structure et de fonction de la rétine. La rétine est le siège de la transformation du signal lumineux en signal électrique qui, conduit par le nerf optique jusqu'au cerveau, nous permet de voir des images. La rétine est composée de différents types cellulaires dont le fonctionnement et les interactions complexes sont nécessaires pour la vision. Notre but est d'utiliser des modèles expérimentaux de toxicité envers les cellules de la rétine pour mimer ces maladies afin de tester l'efficacité de traitements.

Ce projet nécessitera au maximum 2450 rats, 2450 souris et 2450 lapins sur 5 ans.

Afin de respecter la règle des 3R

- Réduction le nombre d'animaux par groupe est limité pour cependant rester adapté à l'analyse des résultats par tests statistiques afin de permettre de conclure sur l'efficacité ou non d'un traitement. Des évaluations non invasives de la pathologie sont utilisées tout au long de l'étude pour éviter la mise à mort de l'animal.

- Raffinement un suivi quotidien des animaux sera effectué afin de minimiser au maximum l'impact sur le bien-être des animaux. Des points limites adaptés, suffisamment prédictifs et précoces permettent de limiter une éventuelle douleur à son minimum. Les animaux sont hébergés dans des cages contenant un enrichissement adapté à l'espèce pour améliorer le bien-être de l'animal. Les examens non invasifs pour évaluer la pathologie sont semblables à ceux pratiqués chez l'homme en cabinet ophtalmologique ou en cabinet vétérinaire. Les examens de l'œil qui requièrent un immobilisme de l'animal pourront être réalisés sous anesthésie pour son confort. Ce projet a été soumis pour évaluation à un comité d'éthique et sera suivi par la structure en charge du bien-être animal de l'établissement.

- Remplacement à ce jour, aucune méthode alternative ne permet de mimer l'œil dans son environnement et dans sa globalité fonctionnelle. En effet, l'œil est composé de différents tissus de physiologie différente soumis aux variations environnementales, aux interactions des tissus et organes voisins. Le projet nécessitera donc d'avoir recours à des animaux compte tenu des particularités de l'organe concerné par le projet et l'absence de méthode alternative.

14561 Les maladies inflammatoires ostéo-articulaires sont parmi les pathologies douloureuses et invalidantes les plus courantes et les plus répandues dans le monde, dont la prévalence devrait augmenter principalement en raison de l'augmentation de l'espérance de vie. Ces pathologies sont le plus souvent difficiles à repérer, mais elles peuvent avoir des répercussions sur l'état psychologique des personnes affectées par les douleurs chroniques qu'elles engendrent, et à plus long terme sur la vie professionnelle. On estime que 25 % des personnes atteintes d'ostéo-arthrite sont incapables d'accomplir leurs activités quotidiennes. De plus en plus de preuves indiquent maintenant que l'inflammation, locale et systémique, est à l'origine de dommages aux articulations et aux os.

Le projet décrit dans cette demande a pour but d'évaluer la pharmacocinétique et l'efficacité thérapeutiques de nouveaux « outils médicaments » dans différents modèles de maladies

inflammatoires ostéo-articulaires, afin de valider leurs propriétés immunomodulatrices, anti-inflammatoires et anti-fibrotiques, afin de les proposer comme nouvelles modalités de thérapies dans le traitement de pathologies inflammatoires ostéo-articulaires. Ce projet s'effectuera chez la souris (*mus musculus*) et utilisera 444 animaux sur 5 ans.

L'exploration de ces modèles utilisera des modalités d'imagerie non invasive permettant de faire du suivi des différents outils thérapeutiques testés après injection chez l'animal et/ou d'évaluer l'étendue des lésions induites à l'aide de marqueurs spécifiques. Un suivi longitudinal des modèles animaux sera ainsi effectué et des prélèvements terminaux seront réalisés pour des analyses histologiques (approche de référence). Les différentes modalités d'imagerie seront associées à une analyse quantitative des images obtenues. Ces approches mises en œuvre permettront d'augmenter la pertinence des modèles établis et de répondre à la réglementation concernant l'éthique animale en appliquant la règle des 3Rs

- Remplacement des animaux d'expérience l'utilisation des animaux ne se fera qu'en dernier recours après des tests préalables de criblage et d'efficacité *in vitro* et *ex vivo*.

- Réduction du nombre d'animaux Le design de l'étude étant un plan d'expérience contrôlé en mesures répétées, le nombre d'animaux est réduit à 8 animaux par groupe.

- Raffinement L'enrichissement du milieu d'hébergement sera contrôlé. Une évaluation quotidienne du bien-être animal sera réalisée selon une grille de scores spécifiques, établie selon des paramètres physiologiques (prise de poids, hydratation par exemple) mais également selon des critères décrivant de façon précise l'apparence physique et le comportement général de chaque animal. Ainsi, l'ensemble de ces observations permet d'intervenir au plus tôt dans la prise de décision de la poursuite du protocole pour un animal donné, cela avant même d'atteindre les points limites pré-établis et fixés par la procédure.

14562 La sclérose en plaques (SEP) est une maladie inflammatoire chronique qui affecte le système nerveux central (SNC). La SEP est normalement diagnostiquée entre 20 et 40 ans et elle touche environ 80 000 personnes en France et atteint deux fois plus les femmes que les hommes. La SEP représente la première cause de handicap chez les jeunes adultes et a de graves répercussions sociales et économiques. La SEP est une maladie inflammatoire chronique caractérisée par l'infiltration de cellules immunitaires et la destruction des fibres nerveuses. Les traitements qui élimine les cellules B (anticorps anti-CD20) peut être bénéfique mais les mécanismes moléculaires ne sont pas connus. Dans ce projet, nous utiliserons un modèle expérimental chez la souris d'inflammation du SNC appelé l'encéphalomyélite expérimentale auto-immune (EAE) qui constitue le modèle animal d'étude de la SEP pour identifier les mécanismes régulant la production de cytokines pro- et anti-inflammatoires dans le SNC.

Pour l'ensemble du projet, il est prévu d'utiliser un maximum de 2604 animaux sur 5 ans. Le projet incluant deux procédures sévères et une étude rétrospective sera effectuée à la fin du projet.

Dans ce projet, nous nous limiterons aux seules expériences considérées comme absolument indispensables, et ce dans le respect de la règle des 3Rs.

1-Remplacement : Cette étude se fait après de nombreuses études *in vitro* dans des modèles cellulaires. Malheureusement le principe de remplacement n'est pas applicable à ce projet car les études *in vitro* ne reproduiraient pas l'ensemble des voies impliquées dans des modèles physiologiques intégrés et par conséquent ne permettent pas l'obtention de résultats scientifiques exploitables et pertinents de la pathologie humaine

2-Réduction les expériences sont organisées de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux. Les résultats actuels ont permis de valider que des lots de 6-8 souris selon les paramètres à évaluer permettent d'acquérir des données fiables.

3-Raffinement les souris sont hébergées dans des cages à 20-24°C et 30-50% d'hygrométrie, en portoirs ventilés (dans des cages d'une superficie de 500cm²), avec une alternance jour/nuit de 12h/12h. La nourriture et l'eau de boisson sont fournies ad libitum. Le change de la litière est réalisé 1 fois par semaine. Du coton ou de l'essuie-tout sont ajoutés pour leur permettre de faire un nid. Les animaux ont une semaine d'acclimatation avant que le protocole ne débute. Les conditions

d'expérimentation font l'objet d'une procédure de suivi du bien-être animal. Les animaux seront suivis quotidiennement à l'initiation du modèle. Un animal sera euthanasié s'il présente un des points limites d'arrêt de la procédure, que nous aurons définis pour limiter la douleur, la souffrance ou l'angoisse de l'animal.

14563 1. Contexte scientifique, médical et social du projet

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est le 6ème cancer en termes de fréquence dans le monde et le plus fréquent des cancers du foie. Avec plus de 700 000 nouveaux cas et plus de 700 000 décès en 2012, le CHC prend la 3ème place dans les décès liés au cancer (Forner, 2018). 90% de CHC sont associés avec la fibrose ou la cirrhose induite par l'infection chronique due au virus de l'hépatite B (VHB) ou C (VHC), la consommation d'alcool, l'exposition à l'aflatoxine b ou encore les désordres métaboliques (El-Serag, 2007).

A ce stade précoce, l'ablation guidée par imagerie et la transplantation sont les solutions thérapeutiques les plus utilisées en clinique, mais ont des limites. Ainsi environ 70% des patients ayant eu le recours à la chirurgie rechutent 5 ans plus tard (Pinyol, 2018). Aujourd'hui de nouvelles thérapies systémiques sont disponibles en clinique, ciblant plusieurs voies cancéreuses à la fois (sorafenib, lenvatinib, cabosantinib et regorafenib). Ces thérapies systémiques ciblent les cellules avec une forte activité de tyrosine kinase, comme les cellules cancéreuses. Cependant, ces traitements ne présentent que de faible amélioration de survie de patient, et induisent des effets indésirables affectant la qualité de vie de patients. De plus, comme le CHC est une tumeur hautement hétérogène, et il n'existe toujours pas de classification moléculaire, il est difficile de guider les cliniciens dans le choix de thérapie.

Le cancer constitue un problème de santé publique majeur. Mon projet se positionne au cœur de cette problématique, ayant pour le but de cerner les patients les plus susceptibles de bénéficier d'une nouvelle immunothérapie, et d'identifier la combinaison thérapeutique la plus efficace dans le traitement du CHC.

2. Objectifs du projet

Une nouvelle molécule thérapeutique qui cible la protéine Y a été développée pour lutter contre le cancer. Notre laboratoire a montré que la protéine Y est surexprimée dans certains types tumoraux et notamment dans le CHC. Le couple protéine Y/récepteurs appartient à une famille de récepteurs membranaires. Le but de ce projet est de « capturer » le ligand pour induire la mort des cellules cancéreuses en combinaison avec la réactivation du système immunitaire. Pour ceci, des modèles de cancer dits syngéniques chez la souris, et présentant une forte expression de protéine Y ainsi que la présence de ses récepteurs, seront utilisés.

L'anticorps anti-protéine Y a été développé par le laboratoire, les objectifs sont de :

- valider l'efficacité de cet anticorps thérapeutiques dirigés contre la molécule Y
- optimiser les doses d'utilisation
- étudier les mécanismes ciblés par cette thérapie en combinaison avec d'autres molécules capables de réactiver une réponse immunitaire.

3. Balance dommages/bénéfices

Les souris BALB/C et C57B6 immunocompétentes ont été décrites dans la littérature comme les plus adaptées pour créer le modèle syngénique de CHC afin de tester les nouvelles molécules destinées à des fins thérapeutiques et ses combinaisons et étudier la réponse du système immunitaire au traitement.

Une lignée de CHC murine sera injectée en sous-cutané pour générer une tumeur. Les animaux seront traités par les injections intrapéritonéales et seront mis à mort après le traitement. Les tumeurs prélevées seront utilisées pour l'anatomopathologie.

Mes expériences permettront d'évaluer l'efficacité de nouvelles thérapies en combinaison avec les nouvelles thérapies capables de réactiver la réponse immunitaire.

Retombées attendues dans le domaine de la cancérologie étant données les possibilités limitées en clinique dans le domaine du CHC, la nouvelle combinaison thérapeutique dans le traitement du CHC pourrait améliorer la durée de vie et la qualité de vie de patients.

4. Conformité avec la règle des 3 R

L'établissement des différentes parties de ce protocole expérimental tient compte des exigences de remplacement, de réduction et de raffinement 1) Les nouvelles thérapies utilisées dans cette étude ont déjà fait l'objet d'une validation *in vitro* qui nécessite d'être confirmée *in vivo*. Les souris immunocompétentes sont indispensables pour tester la réponse immunitaire 2) Les effectifs définis dans ce protocole ont été déterminés grâce au comportement connu de ces modèles expérimentaux et tiennent compte des exigences statistiques nécessaires à l'exploitation des résultats. 3) Une définition précise des points limites et une surveillance adaptée des animaux permettra un contrôle rigoureux de toute douleur animale.

5. Nombre total d'animaux inclus dans ce projet 1080souris

14564 Les ruptures du ligament croisé antérieur (LCA) du genou surviennent fréquemment dans les sports de pivot. Sans traitement, l'instabilité du genou qui en résulte génère des lésions des ménisques, du cartilage, et une arthrose souvent invalidante. Le traitement chirurgical est ainsi souvent proposé, notamment aux sujets jeunes et/ou sportifs, et constitue l'une des interventions les plus pratiquées dans le monde.

Les techniques actuelles reposent sur l'ablation du LCA lésé et son remplacement par un tendon prélevé chez le patient (il s'agit d'une « autogreffe »). Or, des publications récentes montrent que la préservation du ligament rompu, sa suture et le renfort de celle-ci par l'adjonction d'un tuteur synthétique à son contact pendant la durée de sa cicatrisation constitue une alternative moins invasive aux techniques de remplacement (complications liées au prélèvement tendineux). La présence d'un tuteur synthétique dans une articulation génère cependant de l'inflammation mais celle-ci a pu être diminuée expérimentalement en greffant ce tuteur par un polymère bioactif (pNaSS).

Nous avons démontré chez le rat que l'utilisation d'un ligament synthétique résorbable en poly-ε-caprolactone (PCL) comme renfort temporaire du LCA pendant sa cicatrisation constitue une alternative pertinente au remplacement ligamentaire le ligament synthétique permet de s'affranchir du prélèvement tendineux et offre un soutien mécanique immédiat son greffage par le pNaSS a permis de diminuer la réponse inflammatoire générée. Néanmoins, les données recueillies chez le rat ne sont pas extrapolables directement à l'Homme. Ce projet propose d'évaluer dans un modèle animal plus proche de l'homme -donc de l'application clinique envisagée- en termes de taille, un ligament constitué de PCL et de confirmer dans cette espèce le bénéfice apporté du greffage du ligament par le pNaSS.

Objectifs

i) Démontrer qu'un ligament en PCL greffé est bien toléré chez le grand animal de laboratoire (brebis) et qu'il remplit sa fonction de stabilisation de l'articulation au moins aussi bien qu'une autogreffe. Nous comparerons 2 groupes : un groupe traité par la mise en place d'une autogreffe et un groupe traité par un ligament en PCL greffé.

ii) Démontrer le bénéfice apporté par le greffage sur la tolérance et le comportement mécanique du ligament. Nous comparerons 2 groupes : le groupe traité par la mise en place du ligament en PCL greffé, le 2nd par la mise en place du ligament en PCL non greffé.

36 animaux seront utilisés. Des études précédemment effectuées dans un modèle chirurgical similaire dans la même espèce ont démontré que ces effectifs étaient suffisants pour effectuer des études statistiques, compte tenu de la faible variabilité, morbidité et mortalité du modèle.

Il n'existe pas actuellement de modèles *in vitro* ou *in silico* permettant de reproduire la complexité des mécanismes biologiques et biomécaniques impliqués dans la cicatrisation du LCA et la pertinence de nos hypothèses doit être vérifiée sur un animal anatomiquement comparable à l'Homme avant tout essai chez des patients humains. La douleur ressentie par les animaux en

postopératoire est de courte durée (moins d'une semaine), elle sera prise en charge par une analgésie adaptée dont l'efficacité sera contrôlée par l'observation régulière de l'animal. Les animaux ne seront mis à mort qu'au temps terminal de l'étude, ou avant, en cas de nécessité.

14565 Depuis 2004, le cancer est la première cause de mortalité prématurée en France. L'institut national du cancer estime à 382 000 le nombre de nouveaux cas de cancers pour l'année 2018 en France métropolitaine, 184 000 décès pour cette même année.

Il n'existe pas de modèles *in vitro* suffisamment complexes qui puissent mimer le développement d'un cancer. Aussi, dans le but d'étudier les cancers, les chercheurs ont développé, par des techniques de génie génétique, des modèles animaux qui reproduisent la pathologie humaine. Pour des raisons techniques, ces modèles ont été développés chez la souris.

Ce protocole propose le maintien de 4 lignées de souris prédisposant à des cancers du côlon, du poumon, du lymphome thymique et du sein, par un élevage à minima.

Pour chaque modèle, 2 couples reproducteurs assureront le maintien de la lignée, 8 petits transgéniques seront gardés afin d'assurer le renouvellement. Chaque couple sera composé d'un mâle et d'une femelle. Pour chaque procédure d'accouplement, il est tenu compte de la cinétique d'apparition des cancers. Grâce à cette connaissance des cinétiques, il est possible de minimiser l'impact des effets cancéreux sur les souris en renouvelant les couples reproducteurs avant l'apparition des premiers signes cliniques. C'est ainsi que les souris seront mises à mort pour le cancer du côlon à 4 mois, du poumon à 3 mois, du lymphome thymique à 6 mois et du sein à 6 mois. La répartition du nombre d'animaux pour chaque élevage et pour 5 ans est la suivante -colon 130 souris, -poumon 170 souris, -lymphome thymique 90 souris, - sein 90 souris. Soit pour 5 ans, un total de 480 souris. Cependant, un suivi adapté des animaux et la définition précise des points limites précoces et prédictifs d'un mal être animal et adaptés à chaque type de cancer permettent de limiter au maximum la souffrance animale.

Ces modèles de prédisposition à des cancers sont régulièrement utilisés par les chercheurs c'est pourquoi il est nécessaire de les maintenir sous forme respirante. En effet, ces modèles sont précieux pour une avancée dans l'étude des cancers (ex tester l'efficacité d'un médicament-candidat, étudier les mécanismes d'action depuis le développement jusqu'à la progression des cancers)

14566 Outre des enjeux scientifiques, ce projet présente un fort enjeu sociétal et sanitaire. En effet, il s'intéresse à l'ostéoarthrite (OA), ou arthrose, qui est une des formes d'arthrite les plus courantes. Elle touche 250 millions de personnes à travers le monde. C'est une affection chronique dégénérative qui touche les articulations, responsable de douleurs et de multiples désagréments entravant la mobilité. Il s'agit d'une des premières causes d'incapacité fonctionnelle pour les personnes de plus de 40 ans. Les populations principalement touchées sont les sujets sportifs (notamment post-traumatiques) et les personnes âgées. Selon l'OMS, d'ici 2020, l'arthrose deviendra la quatrième cause d'invalidité la plus répandue dans le monde (Source Nutraceuticals world, 2016).

Les peptides de collagène marin ainsi que les extraits poly-phénoliques de pépins de raisin et d'olive possèdent des bénéfices démontrés et décrits dans la littérature sur l'arthrose. Le but de cette étude est d'évaluer l'effet d'un ingrédient Santé d'origine naturelle, associant peptides de collagène et polyphénols, pour les sujets sportifs et âgés susceptibles de développer une arthrose. Pour cela, la toxicité des produits développés seront déterminées *in vitro* par l'évaluation de leur cytotoxicité sur des chondrocytes (cellules du cartilage présentes dans les articulations), fibroblastes (cellules de la membrane synoviales de l'articulation) et macrophages (cellules de la membrane synoviale de l'articulation, mais également cellules immunitaires recrutées sur les sites inflammatoires dont les articulations arthrosiques). Les études *in vivo* complémentaires permettront de valider l'efficacité des produits (seuls ou en association). Une validation objective de l'efficacité biologique sera réalisée sur les différentes formulations de cette association entre peptides de collagène et extraits poly-phénoliques. Ainsi, un modèle d'arthrose post-traumatique, en ôtant le ménisque interne, sera réalisé sur des souris. Un modèle d'arthrose par dégradation des cellules de l'articulation (les

chondrocytes) sera également réalisé par injection de monoïodoacétate au niveau de l'articulation choisie (genou droit).

La règle des 3R sera appliquée dans le cadre de ce projet. L'expérimentation fait l'objet d'une procédure de suivi du bien-être des animaux adaptés à l'expérience et aux potentiels effets indésirables des procédures sur l'état de santé global des animaux. Un animal sera euthanasié s'il présente un des points limites d'arrêt de la procédure, définis pour limiter la douleur, la souffrance ou l'angoisse de l'animal. Les expériences sont organisées de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux en collectant le plus de données possibles. Les mécanismes impliqués dans le développement de l'arthrose sont complexes. Ainsi, cette étude permettra d'étudier dans leur contexte physiopathologique les macrophages et les chondrocytes, cibles thérapeutiques potentielles, et ne peut pas être mimée par une approche de culture cellulaire. L'ensemble de cette étude comprendra 408 souris C57BL/6.

14567 Les maladies inflammatoires et/ou douloureuses chroniques (comme les maladies auto-immunes et allergiques) représentent un problème majeur de santé publique et les approches thérapeutiques utilisées aujourd'hui ne donnent pas entière satisfaction. Il est donc important de comprendre la physiopathologie de ces maladies au niveau cellulaire et moléculaire afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Ceci est basé sur l'utilisation des modèles animaux (lignées pures génétiquement homogènes, environnement "contrôlé") qui reproduisent en majeure partie les caractéristiques cliniques et histopathologiques des maladies humaines. De plus, il est tout à fait possible d'appliquer les résultats obtenus dans les modèles animaux à la pathologie humaine. De nombreux facteurs environnementaux ont été décrits comme participant à la genèse de ces pathologies ou comme facteurs facilitateurs de la mise en place de ces maladies chroniques. Parmi ces facteurs environnementaux, de nombreuses études épidémiologiques placent le stress comme l'un des facteurs majeurs impliqués dans la régulation de la douleur et de l'immunité. L'objectif de cette demande est de comprendre l'association qui pourrait exister entre le stress et l'auto-immunité dans la sclérose en plaques, le stress et l'allergie dans la dermatite et entre le stress et la douleur viscérale chronique. Afin de répondre à cet objectif le nombre d'animaux utilisés sera de 1632 souris en raison de 12 animaux par groupe, minimum nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs. La règle des 3R sera appliquée pour ce projet. Pour ces trois modèles, les animaux seront suivis régulièrement au cours du temps par des techniques non invasives comme le suivi du poids, la consistance des fèces et présence de sang dans les fèces évaluées par le test Hémocult II® et de façon plus spécifique par l'analyse des scores cliniques pour la sclérose en plaques et des mesures d'atteintes cutanées pour la dermatite. L'utilisation de ces techniques non-invasives permet d'observer au cours du temps un seul animal, là où l'information devait être obtenue par euthanasie et autopsie de multiples individus à chaque stade d'une seule étude, permettant ainsi de réduire sensiblement le nombre d'animaux. De plus, afin de suivre la directive européenne 2010/63/UE, un enrichissement sera rajouté aux animaux. A savoir, dans un premier temps, des carrés de coton pur ou du papier absorbant permettant aux animaux de faire une nidation. Selon la durée de l'étude, un deuxième enrichissement pourra être introduit dans l'environnement, tel que des aspen Brick, des tunnels en polycarbonate ou des igloos. Une étude rétrospective sera effectuée à la fin de chaque expérience pour déterminer les possibilités de diminution du nombre d'animaux et/ou d'amélioration des procédures pour diminuer la souffrance animale. Durant toute la période d'expérimentation, l'état général des animaux sera observé quotidiennement. Une veille bibliographique sera effectuée pour déterminer si des méthodes de remplacement ont été mise en place. Pour chaque procédure des points limites ont été définis pour limiter la douleur, la souffrance ou l'angoisse de l'animal et l'animal sera euthanasié s'il présente un de ces points limites d'arrêt de la procédure. De plus, les personnes responsables du projet ont été formées à l'utilisation des animaux à des fins scientifiques elles garantissent de la formation et de l'encadrement des autres expérimentateurs impliqués dans les procédures expérimentales. L'apprentissage et la maîtrise des gestes techniques sont reportés dans les livrets de compétences des personnes concernées. Pour toutes les procédures nécessitant de la chirurgie, les animaux

seront anesthésiés et surveillés jusqu'à leur réveil, un suivi et une observation post-opératoire sera mise en place.

14568 Le vieillissement de la population constitue un enjeu majeur social et de santé publique. En effet, entre 2015 et 2050, la proportion des 60 ans et plus dans la population mondiale va presque doubler, passant de 12% à 22%. De récents travaux montrent une évolution moins favorable de l'espérance de vie sans incapacités dans les dernières années par rapport aux décennies précédentes et il apparaît donc urgent d'intervenir pour ralentir cette progression défavorable. L'important n'est plus d'allonger la durée de vie mais désormais d'améliorer la qualité de vie des personnes âgées. Dans ce contexte, le terme de « fragilité » a émergé pour désigner la diminution de la résistance des personnes vieillissantes face à un stress, augmentant leur vulnérabilité et les exposant à un risque accru d'accidents et/ou de pathologies, pouvant évoluer vers la dépendance. Au cours des dernières années, plusieurs études ont suggéré que l'accumulation progressive de cellules sénescentes dans l'organisme pourrait être le socle de l'apparition de certaines pathologies chroniques liées à l'âge (McHugh, JCB, 2018).

Le but général de ce projet est ici de définir le lien étroit entre la sénescence cellulaire et l'apparition prématurée de la fragilité/vieillesse accélérée au niveau des différents organes. En outre, l'influence de la sédentarité et de l'obésité, deux facteurs de risque majeurs, sera également évaluée.

Nos recherches actuelles visent donc i) à identifier de nouveaux biomarqueurs de fragilité et ii) à trouver de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles *in vivo* afin de contrer les effets délétères du vieillissement.

Nous utiliserons pour cela différentes conditions expérimentales qui miment le vieillissement physiologique et pathologique, ce dernier pouvant être accéléré chez l'animal par l'ingestion d'un régime riche en graisse. Cette approche permettra ainsi l'identification précoce de biomarqueurs et la validation plus rapide des cibles identifiées. L'utilisation de ces modèles est ainsi nécessaire pour reproduire les différentes composantes de la pathologie humaine dans un système intégré, ce qui constitue un gage d'une meilleure transposition vers la clinique dont le besoin en nouveaux traitements est urgent.

Les groupes expérimentaux seront 2 groupes « Normal Chow » (régime normal) avec ou sans roue pour mimer l'activité physique volontaire (analyses réalisées à 6, 12, 17, 21 et 24 mois) et 2 groupes « High Fat Diet » (régime gras) avec ou sans roue (analyses réalisées à 12, 17, 21 et 24 mois). Sur ce projet, un total de 1800 souris non-consanguines seront utilisées

- Groupe contrôle : 6 mois 30 mâles et 30 femelles - 12 mois 40 mâles et 40 femelles - 17 mois 52 mâles et 52 femelles - 21 mois

: 56 mâles et 52 femelles - 24 mois 80 mâles et 60 femelles

- Groupe High Fat Diet (à partir de 6 mois d'âge, les souris appartenant aux groupes concernés recevront un régime HFD, et ce jusqu'au sacrifice) 12 mois 40 mâles et 40 femelles - 17 mois 52 mâles et 52 femelles - 21 mois 56 mâles et 52 femelles - 24 mois 80 mâles et 68 femelles

- Groupe avec roue 12 mois 40 mâles et 40 femelles - 17 mois 52 mâles et 52 femelles - 21 mois 56 mâles et 52 femelles - 24 mois 80 mâles et 60 femelles

- Groupe High Fat Diet+roue 12 mois 40 mâles et 40 femelles - 17 mois 52 mâles et 52 femelles - 21 mois 56 mâles et 52 femelles - 24 mois 80 mâles et 52 femelles

Lors de l'étude et dans un souci de réduction, chaque animal sera utilisé pour mesurer plusieurs caractéristiques (physiologiques, anatomiques, histologiques, biochimiques et moléculaires) du développement de la fragilité. Le nombre d'animaux a été calculé selon la mortalité spontanée liée au vieillissement des animaux et induite par le régime HFD, et ce nombre a été corrigé en fonction du sexe des animaux. Il a été revu à la hausse (soit 1800 animaux total) en fonction du nombre / type d'approches de phénotypage et de la variabilité statistique des données.

Raffinement Les souris seront hébergées dans des portoirs connectés DVC (Cages digitales ventilées) permettant d'identifier précocement toute perte d'activité et de prostration. Un suivi

quotidien des animaux sera effectué. Pour tout signe de douleur ou de souffrance (apathie, vocalises, prostration, perte de poids, etc.), l'animal sortira de l'étude et sera euthanasié.

14569 Diplôme Universitaire de microchirurgie

La microchirurgie est une discipline chirurgicale qui permet de réparer les petits vaisseaux ou les nerfs des doigts, de la main ou du poignet.

Ces techniques permettent, en urgence, de réimplanter les doigts, de suturer les nerfs ou les artères lésés à la main ou au poignet ou de réaliser des reconstructions complexes de la main (lambeaux de couvertures, greffe d'orteil pour reconstruire le pouce par exemple).

Ces sutures des vaisseaux et des nerfs doivent être réalisées par un chirurgien spécialisé. Ces gestes doivent être parfaitement maîtrisés car ils sont réalisés en urgence et le temps est un facteur primordial pour la survie du membre traumatisé et pour le bon rétablissement du patient.

Cette compétence s'acquiert par un Diplôme Universitaire de microchirurgie dans le cadre de la formation initiale du chirurgien de la main, ainsi que par une pratique de la microchirurgie au quotidien.

Les éléments à réparer sont extrêmement fins, et nécessitent une grande habileté micro chirurgicale. Le diamètre des artères digitales est de l'ordre du millimètre. Le chirurgien utilise une loupe binoculaire qui va grossir la zone à réparer. Par une dissection minutieuse, il va isoler une artère collatérale de doigt, un nerf collatéral de doigt ou une micro veine. Il va relier les éléments sectionnés sur un clamp microchirurgical, puis va suturer bout-à-bout le nerf, l'artère ou la veine afin de rétablir la continuité de ces éléments.

Dans le cadre de ce DU, la formation pratique est primordiale. Les entraînements se font d'abord sur un support d'entraînement à l'anastomose pour apprendre à faire les sutures sous la binoculaire, une fois cette étape validée, les étudiants se forment sur des rats (Sprague Dawley) car les vaisseaux et les nerfs du rat ont une dimension proche de ceux des doigts humains. La suture du vaisseau est validé grâce au test de Patency qui permet de voir si le sang passe et donc si l'anastomose est réussie. Il n'est donc pas nécessaire de garder le rat en vie, le rat est mis à mort avant son réveil. Il s'agit d'une procédure réalisée sous anesthésie générale avec emploi d'analgésique où les étudiants sont encadrés par du personnel compétent en expérimentation animale. Le DU est validé avec un examen écrit et pratique.

Les rats sont hébergés par 2 dans des cages de portoirs ventilés d'une surface au sol de 900 cm², à 20-24°C et 30-50% d'hygrométrie, avec une alternance jour/nuit de 12h/12h. La nourriture et l'eau de boisson sont fournies ad libitum. Ils ont un tunnel en carton comme enrichissement. Le change de la litière est réalisé 1 fois par semaine. Les animaux ont au minimum une semaine d'acclimatation avant que le protocole ne débute.

Afin de limiter le nombre d'animaux utilisés, chaque rat est utilisé pour l'opération de 5 artères (2 carotides, 2 fémorales, 1 caudale), 2 veines (fémorales) et 2 nerfs (sciatiques).

10 étudiants s'inscrivent chaque année, ils utilisent chacun 20 rats. Ils s'entraînent pendant 6 mois soit 200 rats/an donc 1000 pour 5 ans. Ce nombre total d'animaux utilisés tient compte aussi des rats utilisés pour l'examen final (1 rat par étudiant).

14570 Le cil primaire émerge de la surface de pratiquement toutes les cellules de l'organisme et s'articule autour d'un squelette de microtubules de tubuline. C'est un organite sensoriel unique qui détecte les stimuli du milieu extracellulaire, les intègre et transmet le signal à l'intérieur de la cellule. De nombreuses voies de signalisation intracellulaires sont maintenant dépendantes du bon fonctionnement du cil primaire le présentant comme une véritable plateforme relayant les signaux du milieu extérieur vers l'intérieur de la cellule. Au cours des 10 dernières années, de nombreuses corrélations ont été faites entre la formation et/ou la fonction du cil primaire, les voies de signalisation engageant les constituants du cil primaire et les voies de signalisation régulant le développement tumoral ainsi que la réponse aux traitements anti-cancer.

En France, on compte 33000 nouveaux cas de cancer colorectal (CCR) par an, responsables de 16000 décès annuels. Malgré l'ampleur de cette pathologie les origines moléculaires de cette maladie restent encore mal comprises. En conséquence, un grand nombre de cas ne peuvent être efficacement soignés. Notre projet est focalisé sur la découverte de nouvelles molécules qui pourraient constituer des marqueurs diagnostique ou pronostique, et des cibles thérapeutiques potentielles des cancers. Les modèles animaux de cancer colorectaux constituent des outils importants pour étudier le développement et la pathogenèse des CCR. Ces modèles sont utilisés pour appréhender les mécanismes physiopathologiques et ainsi développer des traitements du CCR humain. Par exemple, les modèles animaux permettent de suivre/mimer la séquence des changements dans le comportement cellulaire et la biologie de la tumeur qui est observée chez l'homme. Enfin, les modèles animaux permettent aussi d'évaluer la réponse tumorale à de nouvelles stratégies chimio-protectrices et thérapeutiques.

Le projet vise à établir l'implication des molécules d'intérêt dans les différents compartiments cellulaires du colon et du système immunitaire associé, ainsi que leur contribution au développement du CCR. Il se déroulera en 5ans et permettra d'étudier les 3 aspects suivants

- 1- Rôle du cil primaire sur la carcinogénèse colorectale associée à une inflammation.
- 2- Importance des modifications post-traductionnelles de la tubuline sur la formation et/ou fonction du cil primaire et leurs conséquences sur la carcinogénèse colorectale.
- 3- Caractérisation des composants des voies de signalisation essentielles dans le développement du CCR.

REMPACER Nous pouvons envisager l'utilisation d'organoïdes issus de cellules épithéliales intestinales pour étudier le caractère autonome des modifications génétiques dans les cellules épithéliales intestinales. Par contre, Il n'existe pas d'alternative autre que l'utilisation d'animaux génétiquement modifiés pour évaluer avec précision et pertinence, le rôle physiopathologique des nouveaux gènes de notre étude dans le dialogue qui peut se mettre en place entre les cellules tumorales et les cellules de l'environnement. Nous utiliserons le modèle souris *mus musculus*, permettant l'inactivation de manière tissu-spécifique et inducible des gènes d'intérêt.

REDUIRE L'étude que nous présentons a déjà été réalisée sur d'autres lignées de souris et nous pouvons déjà définir avec précision le nombre de souris suffisant par groupe pour chaque procédure. Ce nombre a été validé par le service de statistique de notre institut pour atteindre une puissance statistique de 80%.

RAFFINER Toutes les dispositions ont été prises pour le raffinement des conditions d'élevage et d'expérimentation. Notamment, il existe au niveau de l'animalerie une structure du bien-être animal (SBEA). Le bien-être animal est évalué quotidiennement. Les procédures expérimentales sont parfaitement définies et ont été publiées et validées par le comité de pilotage de l'animalerie de l'institut. Quand une procédure est identifiée comme "à risque de souffrance", les cages sont clairement étiquetées pour augmenter la surveillance. Une attention particulière est portée à la formation de l'expérimentateur afin de limiter la durée de la procédure expérimentale et ainsi réduire la douleur et limiter les variations expérimentales. Une fiche de suivi est établie pour chaque animal de la procédure expérimentale.

Cette étude représente l'utilisation de 6660 animaux pour 27 lignées de souris, soit une moyenne en moyenne 250 animaux pour lignée.

- 14571** Le projet de l'équipe est de comprendre les mécanismes physiopathologiques des déficiences intellectuelles associées à des changements du nombre de copie d'un gène ou d'un ensemble de gènes, comme par exemple la trisomie 21 (Syndrome de Down) ou certains syndromes autistiques. Ces maladies rares induisent des pertes d'autonomie importantes avec des conséquences pour les familles et la société. Pour l'étude de ces déficiences intellectuelles nous avons choisi d'utiliser une approche avec des modèles murins parce que la souris partage beaucoup de systèmes communs avec l'homme au niveau anatomique, cellulaire, biochimique, et moléculaire.

D'une part les fonctions cérébrales de souris fonctionnent de façon similaire avec l'homme. Ainsi on retrouve chez ces petits rongeurs, des comportements comme l'inquiétude, l'agression, la mémoire et d'autres réponses émotives. Au niveau génétique, la souris est proche de l'homme.

D'autre part, il existe dans ce modèle animal des outils de génétique moléculaire qui permettent de créer artificiellement des variations du nombre de copies (duplication ou délétion de région d'intérêt). Nous avons construit plusieurs modèles comportant des variations du nombre de copies de gènes associés à différents syndromes avec retard mental (trisomie 21 ou autisme). Nous avons déjà montré dans ces différents modèles des défauts d'apprentissage et de mémoire.

Cependant, à ce jour, très peu de données existent sur l'évaluation des fonctions exécutives dans ces modèles animaux pathologiques, alors que beaucoup d'études montrent des déficits importants chez les patients. Les fonctions exécutives représentent une série de fonctions de contrôle de haut-niveau. Elles correspondent aux capacités nécessaires à une personne pour s'adapter à des situations nouvelles, c'est-à-dire non routinières, pour lesquelles il n'y a pas de réponse toute prête, automatique ou immédiate.

Un test très simple permet d'évaluer ces fonctions exécutives chez la souris. Nous nous proposons de réaliser ce test sur nos modèles souris pour la Trisomie 21 et l'autisme. C'est un test avec peu de préjudice sur les animaux, car totalement non invasif la souris sait nager naturellement et est simplement placée dans une piscine pour trouver une plateforme de sortie indiquée par un drapeau. Dans le déroulement du test, elle devra changer son apprentissage initial, montrer une flexibilité cognitive pour atteindre la plateforme.

Les bénéfices de ce projet sont la possibilité d'étudier les fonctions exécutives et voir si elles sont affectées dans nos modèles pathologiques. Nous proposons de passer 10 modèles de trisomies avec des complexités génétiques variables allant de plus de 200 gènes à un gène unique en 3 copies, et 12 modèles d'autismes d'origine génétique pour plusieurs gènes et régions génétiques. L'ensemble de ces modèles correspond à des maladies génétiques observées chez l'homme et avec ces études nous pourrions évaluer la portée de ce test pour évaluer les fonctions exécutives chez la souris. Cela permettra dans le futur de

- 1) Comprendre les origines physiologiques et développementales de ces fonctions et des défauts associés

- 2) Identifier les voies moléculaires perturbées.

- 3) Proposer d'éventuels traitements thérapeutiques.

Règle des 3R

Remplacement Dans nos modèles de déficience intellectuelle, l'origine est souvent précoce au cours du développement embryonnaire. La compréhension des mécanismes physiologiques et moléculaires ainsi que les origines développementales de la pathologie requièrent l'étude d'un organisme vivant dans son intégrité et sa globalité et il n'existe donc pas de méthode autre que l'étude *in vivo*. D'autre part, la souris est la seule espèce physiologiquement et génétiquement assez proche de l'Homme dans laquelle nous pouvons réaliser les manipulations génétiques pour obtenir ces modèles de pathologies humaines par variation du nombre de copies de gènes ou de fragments chromosomiques de plus ou moins grande importance.

Réduction Chaque modèle passera un test permettant l'évaluation des fonctions exécutives. Ce test simple a peu d'impact pour les animaux et ne dure que 3 jours. Le test nécessite 1 cohorte de 30 souris mâles et 1 cohorte de 30 souris femelles, chaque cohorte comprenant 15 mutants (trisomiques ou autistes) et 15 contrôles. La totalité de ces expériences nécessitera donc l'utilisation de 60 souris par modèle expérimental. Pour l'étude des 22 modèles nous utiliserons donc 1320 souris. Ce nombre est basé sur une analyse statistique prospective, en fonction de notre expérience et de données publiées dans la littérature pour atteindre des résultats exploitables de manière statistique. Les données obtenues sont généralement de distribution normale, la statistique utilisée sera un test ANOVA Mesure répétées avec test de Turkey en post-hoc. A l'issue de ces tests, un lot d'animaux (6 de chaque génotype/sexe) seront utilisés pour des études histologiques des structures associées aux fonctions exécutives. Les autres animaux seront euthanasiés.

Raffinement Le test n'entraîne pas de souffrance sévère pour l'animal. Cependant, comme le suivi du bien-être animal est primordial pour le bon déroulement des analyses comportementales, tout au long du projet, les animaux feront l'objet d'un suivi quotidien permettant de s'assurer de leur bien-être et de leur santé à tous temps. D'autre part, le milieu sera enrichi par l'apport de matériel permettant aux animaux de faire des nids.

14572 Ce projet repose sur l'évaluation de substrats iodés et fluorés des transporteurs des monocarboxylates MCT1 ou MCT4 utilisables en tant que radiotracteur pronostic du cancer du sein triple négatif.

Par une action conjointe de MCT1 qui permet l'influx de lactate dans les cellules et de MCT4 qui participe au processus inverse, certains auteurs ont même émis l'hypothèse d'une navette métabolique entre les cellules cancéreuses en situation d'hypoxie ou en condition de normoxie.

Ainsi, MCT1 et MCT4 sont maintenant largement identifiés comme des biomarqueurs surexprimés dans de nombreux types de cancers où ils constituent un facteur de mauvais pronostic, notamment dans le cas des cancers du sein. Dans le cadre de la recherche de nouveaux traitements anticancéreux, des chercheurs se sont focalisés sur le développement d'inhibiteurs de MCTs comme nouvel outil thérapeutique.

Actuellement, seule une analyse sur biopsie permet de caractériser la présence ou non de ces 2 transporteurs.

Ainsi, le développement de radiotraceurs spécifiques des MCTs ouvrirait alors la porte d'une imagerie pronostic et d'un suivi thérapeutique plus spécifique. De plus, ces radiotraceurs serviraient de test compagnon aux thérapies développées à l'heure actuelle vis-à-vis de ces nouveaux biomarqueurs.

Le projet se compose de 2 études tout d'abord une étude de mise au point de deux modèles *in vivo* de cancers du sein triple négatif puis une étude de biodistribution des molécules radiomarquées sur souris nudes femelles porteuses de xénogreffes en imagerie.

Le nombre d'animaux inclus dans ce projet a été optimisé conformément à la règle des 3Rs (Remplacement, Réduction, Raffinement). L'ensemble du projet comprendra 640 souris nudes femelles sur 5 années.

Ce nombre a été calculé afin de garantir une valeur statistique à l'étude menée.

En effet, de nombreuses études *in vitro* réalisées en amont on permet de remplacer l'utilisation des animaux. Cependant, ces études sur cellules ne peuvent pas se substituer aux études sur un organisme entier afin d'évaluer les effets potentiellement indésirables sur d'autres organes d'une nouvelle thérapie. Au cours de ce projet, le nombre d'animaux nécessaire est réduit au maximum en sélectionnant uniquement les expérimentations essentielles.

La surveillance quotidienne des animaux permettra de déceler les premiers signaux de stress, de douleurs ou d'inconfort pour l'animal qui pourront être améliorés par l'administration d'antalgiques avant l'atteinte des points limites définis. Les conditions d'hébergement seront optimisées (portoirs ventilés, température, hygrométrie, luminosité, densité animale, enrichissement de milieu avec coton pour la nidification, bâtonnet de bois pour ronger et cabane de cachette).

14573 Ce projet, qui s'inscrit dans le programme d'enseignement de l'anatomie vétérinaire à destination des étudiants vétérinaires, a pour but de fournir des cadavres de carnivores domestiques spécialement préparés afin de permettre leur dissection sur une durée de deux semaines lors des séances de travaux pratiques.

L'Anatomie représente une discipline fondamentale dans l'exercice de la médecine vétérinaire car elle fournit aux étudiants les outils nécessaires à la pratique des disciplines biologiques affines qui leur seront enseignées plus tard dans le cursus. L'intérêt des supports iconographiques d'enseignement reste limité car ils ne sollicitent que la vue de l'étudiant; or l'apprentissage de l'anatomie doit obligatoirement être actif et passer par le toucher, d'où la nécessité des travaux pratiques de dissection. Ces derniers sont très difficilement réalisables sur cadavres d'animaux

euthanasiés pour raison médicale ou morts de manière naturelle; et ce, pour des raisons logistiques (difficulté d'obtention du consentement des propriétaires pour l'embaumement et la dissection du corps de leur animal de compagnie) et pédagogiques (les organes et leurs rapports peuvent être sévèrement modifiés chez des animaux malades). Afin d'assurer la continuité de l'enseignement chaque année universitaire, il est donc nécessaire d'utiliser des chiens de laboratoire adultes réformés (i.e. animaux destinés à l'euthanasie).

La stratégie mise en place pour réduire le nombre d'animaux est de compléter les dissections par l'utilisation d'autres supports pédagogiques (mannequins, pièces anatomiques issues de collections, images radiographiques, tomodensitométriques et issues de l'IRM), amenant ainsi à l'utilisation de 10 chiens par année universitaire soit au total 50 chiens sur la durée du projet. La stratégie utilisée pour diminuer la douleur, la souffrance et l'angoisse liées à la procédure est de réaliser une anesthésie et une analgésie des animaux.

14574 La lipolyse correspond à une dégradation enzymatique de la matière grasse laitière qui conduit à l'accumulation d'acides gras libres (AGL) dans le lait. L'accumulation dans le lait et les produits laitiers de ces AGL issus de cette dégradation provoque l'apparition de goûts rance et butyrique elle contribue aussi au goût amer même si cette flaveur est plus généralement associée aux produits issus de la protéolyse. La plupart des consommateurs ne tolère pas la flaveur d'un lait dont la teneur en AGL est trop élevée. Les laits qui présentent des taux de lipolyse élevés à leur arrivée en laiterie sont donc écartés de la chaîne de production. Cette non-valorisation du lait entraîne outre le gaspillage de matières premières, des pertes financières pour les entreprises.

Le taux de lipolyse est parallèlement devenu un critère de paiement du lait dans certaines régions françaises depuis 2012. Au-dessus d'une valeur fixée par l'interprofession laitière, le point de pénalité est de -3,049 € pour 1000 L.

La lipolyse du lait affecte donc à la fois l'aptitude à la valorisation du lait par le transformateur et le revenu de l'éleveur.

Depuis les années 2000, les industries laitières constatent de nouveau une augmentation des phénomènes de lipolyse dans les laits de collecte en France. Parfois, aucune cause n'est identifiée. Les intervenants en élevage peinent à conseiller les éleveurs pénalisés pour des niveaux de lipolyse trop élevés. Globalement, la filière manque de références récentes sur les facteurs de variations de la lipolyse du lait.

Des premiers essais indiquent que la lipolyse est plus élevée dans le lait du soir lorsque l'intervalle entre la traite du matin et celle du soir est de 10 h.

L'objectif de cet essai est d'étudier l'impact du rythme de traite (10 h entre traite du matin et du soir – 14 h entre traite du soir et traite du lendemain matin 14 h – 10 h 12 h – 12h) sur la lipolyse du lait de vaches. Nous allons travailler avec 21 vaches laitières pendant 8 semaines.

Nous veillerons au respect de la règle des 3R remplacer, réduire, raffiner. La lipolyse étant un phénomène physiologique lié à la production laitière, il n'est pas possible de remplacer l'expérimentation sur des vaches qui produisent du lait par des mesures *in vitro*. Le nombre minimum d'animaux nécessaires à la mise en évidence de différences entre les traitements est calculé. Les animaux sont maintenus dans un environnement adapté à leur besoin. Les indicateurs de souffrances de l'animal tels que la baisse de l'ingestion ou la perte de production laitière sont observés.

14575 Ce projet propose d'étudier l'utilisation d'odeurs de type sexuelles (« phéromones »), comme outil complémentaire aux approches existantes pour la lutte contre les pullulations de campagnols terrestres (*Arvicola terrestris*). Ces pullulations sont en effet responsables d'importants dégâts sur les prairies dans les régions d'élevage.

Du fait de leur vie nocturne ou souterraine qui rend peu efficace les indices visuels, l'olfaction joue un rôle majeur dans la communication sociale et sexuelle chez de nombreuses espèces de rongeurs (souris, rat, hamster, campagnols américains...). Les signaux olfactifs utilisés qui sont notamment

contenus dans l'urine permettent de signaler le territoire, d'informer sur l'état physiologique ou d'attirer un partenaire sexuel.

Des composés olfactifs ont été préalablement identifiés chez le campagnol terrestre dans l'urine, mais aussi au niveau des glandes latérales qui pourraient aussi servir au marquage olfactif.

Nous désirons tester le pouvoir attracteur sur le plan comportemental des composés olfactifs candidats identifiés. Il est à noter que l'utilisation de « phéromones », représente un certain nombre d'avantages indéniables. Tout d'abord les phéromones sont des composés espèce-spécifiques elles présentent ensuite un haut degré de spécificité dans le couplage stimulus-réponse (entre la molécule utilisée et la réponse des congénères), ce qui assure que d'autres espèces proches ont un risque faible de répondre à ces composés. Par ailleurs, ce couplage est généralement assuré à des concentrations très faibles de molécules (par ex. dans le cas de la phéromone mammaire chez la lapine de l'ordre de quelques ng/ml). Enfin, ces molécules sont des résidus du métabolisme et donc sans danger pour l'environnement (car plus efficaces à des doses très faibles).

Pour évaluer le pouvoir attracteur des composés olfactifs candidats, nous utiliserons 216 animaux lors des tests olfactifs.

Concernant les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement

-L'étude du comportement ne peut pas se faire via des méthodes alternatives telles que la modélisation ou l'étude *in vitro*. L'utilisation d'animaux est donc nécessaire pour évaluer l'effet comportementale des composés olfactifs candidats.

-Le nombre d'animaux a été réduit au maximum en tenant compte de la variabilité des réponses comportementales afin de maintenir une puissance statistique satisfaisante

-Les animaux seront hébergés dans des cages placées dans la pénombre pour mimer l'habitat naturel de ces rongeurs et leur permettre une activité normale. Les Campagnols recevront une nourriture comprenant des végétaux frais. Les cages comprennent des cachettes et du matériel leur permettant de faire leur nid. Ils sont manipulés avec précaution par un personnel formé à l'élevage d'animaux de la faune sauvage. Notre projet ne doit pas provoquer de dommages physiques sur les animaux. Cependant, si des animaux tombent malades ou sont blessés accidentellement, ils seront pris en charge, tant que les soins, eux-mêmes, ne génèrent pas un stress trop important chez ces rongeurs qui peuvent être facilement effrayés par les manipulations. Si le traitement n'est pas possible, nous procéderons à l'euthanasie si la souffrance se maintient.

14576 L'épidémie mondiale d'obésité devient un enjeu économique et de santé publique pour de nombreux pays car elle est souvent associée au développement de maladies cardio-vasculaires et à l'apparition de diabète. L'obésité est également souvent associée à une diminution de la fertilité chez l'homme comme chez la femme et à des problèmes d'ovulation (cycles ovariens irréguliers, aménorrhées) chez cette dernière. La production de gamètes (ovules, spermatozoïdes) est sous le contrôle d'hormones produites par une région du cerveau, l'hypothalamus. Les neurones de l'hypothalamus sont les cibles de signaux hormonaux produits par les organes de la périphérie et déversés dans le sang qui vont moduler l'activité cellulaire des neurones. De plus en plus d'hormones produites en concentrations excessives par le foie, l'estomac, et le tissu adipeux lors d'un déséquilibre métabolique sont identifiées mais les mécanismes par lesquels elles interagissent avec les neurones impliqués dans le contrôle de la reproduction ne sont pas encore élucidés.

L'objectif de ce projet est donc de mieux connaître les interactions entre les hormones associées au métabolisme notamment l'IGF1 (Insulin Growth Factor 1), l'apéline, la somatostatine et l'hormone de croissance (GH) avec les neurones qui contrôlent la reproduction.

Notre étude s'inscrivant dans le cadre de l'intégration de l'état métabolique par différents groupes de neurones interagissant entre eux pour synchroniser l'activité reproductrice, il est indispensable de réaliser ces travaux chez l'animal vivant (Remplacement impossible par des méthodes *in vitro*). Néanmoins les expériences ont été conçues dans le souci de se conformer à la règle des 3R en limitant le nombre d'animaux au strict minimum par expérience permettant une analyse statistique fiable et une exploitation des résultats obtenus. Le nombre de tests et donc d'animaux concernés pourra être réduit par la réalisation d'expériences préliminaires sur des sections de cerveau

surnuméraires d'expériences précédentes afin de cibler les populations neuronales concernées par une influence de l'hormone métabolique.

Le projet sera réalisé sur un total de 96 rats.

Les rats seront hébergés par trois dans des cages équipées d'objets en cartons (boîtes à œuf, tubes) leur permettant d'exprimer leurs comportements sociaux habituels (enrichissement du milieu Raffinement). Toutes les procédures nécessaires seront mises en œuvre pour limiter les stress pré et post-opératoires et nous mettrons en œuvre l'analgésie et l'anesthésie pré-, per- et post-opératoire lors des procédures les plus sévères. Chaque procédure modérée ou sévère sera associée à des critères d'arrêt qui seront mis en œuvre si l'animal présente une altération sévère de son comportement ou de ses paramètres physiologiques. En fin d'expérience, tous les échantillons seront stockés et le tissu non utilisé pour ce projet pourra être utilisé pour des expériences préliminaires d'un futur projet.

14577 Les cancers sont un problème majeur de santé publique et font l'objet de nombreux programmes de recherche dans le monde. En dépit des progrès de la médecine et des traitements tels l'immunothérapie impliquant les check point inhibiteurs limitant le risque de récurrence du cancer, tous les patients ne répondent pas à ces traitements. Une meilleure compréhension de la réponse immunitaire anti-tumorale ainsi que le développement de nouvelles stratégies d'immunothérapie sont donc essentielles.

Nous savons que la réponse immunitaire est essentielle pour éliminer la tumeur, que ce soit par la réponse innée (cellules NK, cellules présentatrices d'antigènes) ou par la réponse adaptative (lymphocytes T et B).

Nous proposons ici de tester *in vivo* l'effet thérapeutique d'anticorps monoclonaux (AcM) spécifiquement développés pour stimuler les cellules immunitaires humaines. Nous aurons dans un premier temps criblé les AcM produits dans des tests *in vitro* pour n'étudier *in vivo* que les AcM susceptibles d'avoir un effet thérapeutique. *In vivo* les cellules immunitaires humaines devront migrer sur le site tumoral et attaquer une structure hétérogène faite de cellules endothéliales, de fibroblastes et de cellules tumorales. Ce modèle complexe, beaucoup plus proche de la réalité clinique nous permettra d'apprécier l'efficacité préclinique de notre stratégie.

Dans cette saisine, la règle des 3R sera suivie de la façon suivante

- Remplacer Les AcM que nous souhaitons tester *in vivo* ont déjà été validés *in vitro*. Cependant le passage aux modèles *in vivo* est indispensable pour définir les effets des anticorps thérapeutiques dans des contextes inflammatoires plus complexes. A notre connaissance, il n'existe pas à ce jour de modèle *in vitro* mimant la situation complexe que constitue le système immunitaire humain c'est pourquoi nous avons besoin d'utiliser un modèle de souris humanisées.

- Réduire Puisqu'il n'existe pas d'autres modèles complexes pour valider l'effet des anticorps, les données issues de ce projet devront donc être suffisamment robustes (c'est-à-dire validées avec tests statistiques). Nous utiliserons des tests statistiques non paramétriques (Test de Mann-Whitney) car nous ne pourrions pas nous assurer d'une distribution normale ($n < 30$). Nombre total d'animaux = 3270 sur 5 ans (valeur haute, certainement moins d'animaux dans cette saisine).

- Raffiner Les souris seront hébergées par 5 dans des cages sur portoir ventilé avec des nidifications à base de cartons et de tunnels. Les souris ont accès libre à l'eau et à la nourriture et sont maintenues dans un cycle jour/nuit de 12h/12h. Les animaux seront suivis quotidiennement lorsque les cellules humaines seront injectées et les signes cliniques notables et sévères décrits dans cette saisine seront notés. Lorsque 3 signes cliniques notables ou un seul signe clinique sévère seront notés alors les animaux seront sortis du protocole et euthanasiés. Tous les animaux seront analysés post-mortem avec des prélèvements d'organes en vue d'études immunohistochimiques ou histologiques permettant de caractériser au mieux l'effet des molécules testées.

14578 La sclérose latérale amyotrophique (SLA), ou maladie de Charcot, est une maladie neurodégénérative. Elle se déclare à l'âge adulte (40-80 ans) et évolue, en 3 à 5 ans, vers la paralysie complète et le décès du patient. Elle est causée par la mort des motoneurones (cellules

contrôlant les mouvements du corps), entraînant un affaiblissement progressif et une atrophie des muscles. C'est la plus fréquente des maladies du motoneurone chez l'adulte. A ce jour, il n'existe pas de traitement contre la SLA car les mécanismes physiopathologiques sont méconnus. La SLA touche les deux sexes et son incidence augmente avec l'âge à partir de 40 ans. Elle peut dans certains cas être associée à des troubles cognitifs de type démence fronto-temporale (DFT). Dans une cohorte humaine de patients souffrant de la forme DFT-SLA, une mutation a été identifiée sur le gène d'une protéine mitochondriale. La mitochondrie est un petit organite indispensable dans les processus énergétiques cellulaires. Pour comprendre comment la mutation du gène mitochondrial peut conduire à la mort des motoneurones, un modèle murin porteur de la mutation d'intérêt a été généré. Ce modèle murin s'est révélé être un modèle reproductible de la pathologie observée chez les patients porteurs de cette mutation d'intérêt en développant une myopathie mitochondriale et des signes d'atteinte du motoneurone. De manière notable, cette souris est le premier modèle murin présentant une atteinte du motoneurone ayant pour origine une mutation au niveau d'un gène mitochondrial. Notre projet de recherche a pour but de comprendre comment un dysfonctionnement mitochondrial conduit à une atteinte du motoneurone. Pour répondre à cet objectif, nous voulons identifier et caractériser la séquence des événements reliant l'atteinte mitochondriale et l'atteinte neuronale dans ce modèle murin. Les organes seront récupérés après la mort de l'animal pour des analyses biologiques et biochimiques (analyses de l'atteinte mitochondriale et de marqueurs neuromusculaires). La compréhension des mécanismes reliant l'atteinte mitochondriale à la dégénérescence des motoneurones est primordiale dans le but de développer une stratégie thérapeutique. Dans un but de remplacement, des expériences ont été réalisées précédemment sur des cellules en culture. Les expériences réalisées sur des fibroblastes issus de patients porteurs de la mutation d'intérêt nous ont permis d'identifier de potentiels mécanismes impliqués dans les atteintes mitochondriale et neurodégénérative. Des expériences réalisées sur des cellules de patients reprogrammées vers l'état embryonnaire et ensuite différenciées vers les cellules de l'organe d'intérêt présente un potentiel important pour remplacer et réduire l'utilisation de l'animal. Cependant, la pathologie touchant plusieurs organes, seul un modèle animal permettra de comprendre et d'étudier les conséquences multiples de cette mutation sur les mécanismes moléculaires conduisant aux atteintes mitochondriale et neurodégénérative. Un maximum de 432 souris sera utilisé pour ce projet, en fond génétique C57BL/6N, qui se déroulera sur une durée de 4 ans. Parmi ces 432 animaux, 216 animaux (porteurs de la mutation d'intérêt) présenteront un phénotype dommageable, les autres animaux étant les souris contrôles. Dans un but de réduction du nombre d'animaux à utiliser pour cette étude, des statistiques prédictives ont été réalisées dans le but d'utiliser le minimum d'animaux nécessaires. Les animaux obtenus par élevage seront utilisés pour comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans les atteintes mitochondriale et neurodégénérative. Dans un but de raffinement, l'utilisation d'une fiche d'observation détaillée (en lien avec le phénotype attendu de DFT-SLA) permettant un suivi optimal des animaux sera mise en place. Les animaux seront observés hebdomadairement, ce qui permettra d'identifier précocement tout signe clinique, de stress ou de douleur. Le phénotype de DFT-SLA étant associé à une perte de poids, les animaux seront pesés une fois par semaine. Lorsqu'une perte de poids sera observée, une surveillance accrue sera réalisée (2 fois par semaine ou tous les jours suivant le pourcentage de perte de poids), de l'eau et de la nourriture géliifiés seront également ajoutés dans la cage. Si, lors de cette surveillance hebdomadaire, un stress est observé, un enrichissement de la cage sera réalisé et une surveillance accrue sera effectuée.

14579 L'hépatite aiguë alcoolique (HAA) est un syndrome clinique apparaissant chez les patients consommant de l'alcool de manière chronique et excessive. Les patients se présentent souvent avec une jaunisse évoluant depuis moins de 3 mois et un syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS) pouvant évoluer vers une insuffisance hépatique aiguë sur chronique. Lorsque l'épisode est sévère, la mortalité atteint 30 à 40 % à 28 jours d'évolution. Le traitement optimal requiert une équipe pluridisciplinaire associant un hépatologue, un addictologue, un nutritionniste et une assistante sociale. La corticothérapie est le seul traitement validé dans l'hépatite aiguë alcoolique sévère mais son utilisation est limitée par l'absence de réponse au traitement dans 40% des cas, des potentiels effets secondaires et l'absence de bénéfice sur la mortalité au-delà de 28

jours. Malgré des bénéfices de plus en plus évidents, l'accès à la greffe hépatique reste encore peu fréquent pour ces patients en échec de la corticothérapie étant donné la pénurie de greffon et la réticence à greffer des malades non sevrés en alcool. Un nombre significatif de patients se retrouve sans alternatives thérapeutiques.

Bien que ce problème de santé publique soit majeur, les mécanismes physiopathologiques restent partiellement compris. De plus, la consommation excessive et/ou chronique d'alcool modifie la perméabilité intestinale et le microbiote fécal ce qui va augmenter les signaux associés aux pathogènes.

Ces signaux pro-inflammatoires vont activer les globules blancs résidents dans le foie et en recruter d'autres en provenance de la moelle osseuse. Cet infiltrat en Globules blancs constitue ainsi un élément caractéristique de l'hépatite aiguë alcoolique.

À la surface de ces globules blancs, on retrouve plusieurs molécules pro-inflammatoires comme TREM-1 (pour « Triggering receptor expressed on myeloid cells 1 ») qui est un récepteur membranaire pro-inflammatoire. Il a été montré très récemment que cette voie de signalisation joue un rôle important dans l'inflammation et la fibrogenèse hépatique.

Cette implication de TREM-1 dans l'inflammation a également été démontrée dans de nombreuses maladies inflammatoires le blocage de la voie TREM-1 par la molécule LR12 est actuellement testée en phase 2 dans le choc septique. On retrouve également un rôle important de cette voie de signalisation dans le cancer du foie, l'hépatite B, la stéato-hépatite non alcoolique, les colites et l'athérosclérose. Mais il existe encore trop peu de données sur la contribution de TREM-1 à la physiopathologie de l'hépatite aiguë alcoolique alors qu'on comprend bien qu'elle peut jouer un rôle fondamental.

Dans cette étude, nous souhaitons évaluer le potentiel thérapeutique de la molécule LR12 qui est un inhibiteur de TREM-1 dans le traitement de l'hépatite aiguë alcoolique chez la souris. À ce jour, la souris reste le meilleur modèle d'hépatite aiguë alcoolique. Les résultats de cette étude pourraient conduire au développement d'une étude de phase 2 chez l'homme.

1. Remplacement Il n'existe aucune approche *in vitro* qui pourrait nous permettre d'étudier le rôle de TREM-1 dans le développement d'une pathologie inflammatoire multifactorielle comme l'Hépatite Aiguë Alcoolique. Une étude chez un organisme vivant est indispensable pour mettre en évidence l'effet de l'inhibition de TREM-1 sur l'ensemble des paramètres (Cellules immunitaires, microbiote, dysfonction mitochondriale, hépatocytes...) contribuant au développement de l'HAA et évaluer réellement le potentiel thérapeutique du peptide.

2. Réduction L'étude sera menée avec un nombre total de 106 animaux afin de constituer les différents groupes d'analyses. Initialement, chaque groupe comportera 10 animaux un nombre recommandé dans les études car nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement significatifs, au vu des analyses qui seront conduites à partir de ces animaux.

3. Raffinement Dès leur réception, les animaux auront une période d'acclimatation d'une semaine pour s'adapter à leur nouvel environnement. Ils seront hébergés dans une animalerie dotée de tous les paramètres nécessaires (température, hygrométrie, filtration de l'air, ...) à leur bien-être. L'HAA sera induite par l'administration d'un régime alimentaire liquide à base d'éthanol associé à des acides gras insaturés pendant 1 semaine pour acclimater les souris puis en continu pendant 6 semaines suivi d'un binge d'éthanol selon le modèle internationalement validé de Gao-binge modifié. Le traitement thérapeutique sera réalisé par injection intra-péritonéale quotidienne du peptide durant 2 semaines par un personnel technique qualifié. Par ailleurs, une procédure d'estimation (avec des paramètres définis) et suppression de la souffrance sera mise en place. Le point limite sera fixé à 20% de perte du poids corporel avec identification des signes de mal-être définis au préalable par notre vétérinaire référent. En fin de protocole, les animaux seront mis à mort et des prélèvements d'organes seront effectués pour permettre de réaliser les analyses biochimiques et immunopathologiques.

14580 L'obésité chez les enfants est en nette augmentation. Les enfants en surpoids et obèses sont susceptibles de rester obèses à l'âge adulte et sont exposés à un risque plus élevé de développer

des affections potentiellement mortelles telles que le diabète et les maladies cardiovasculaires. L'obésité chez les enfants affecte également profondément la santé physique, le bien-être social et émotionnel des enfants et leur estime de soi. Malheureusement, il n'existe pas d'options pharmacologiques disponibles ni d'autres stratégies thérapeutiques efficaces capables de lutter contre cette maladie, principalement parce que les mécanismes responsables de la prise de poids ne sont pas complètement compris. Des études récentes nous ont appris que cette maladie est probablement héritée de la mère, c'est-à-dire qu'elle est transmise à l'enfant par des mères obèses avant la grossesse ou par des mères exposées à une alimentation riche en calories pendant la grossesse ou l'allaitement. Pendant la vie embryonnaire et la lactation, plusieurs neurones clés situés dans une région du cerveau appelée hypothalamus sont en train de se former et de développer leurs mécanismes fonctionnels. Dans des conditions normales, ces neurones jouent un rôle très important dans le contrôle du poids corporel et du taux de sucre dans le sang du nourrisson. L'exposition de la mère à des régimes riches en calories pendant la grossesse ou l'allaitement provoque une modification de la formation de ces neurones cérébraux chez le nouveau-né, ce qui, à son tour, prédispose le nourrisson à l'obésité et à ses complications métaboliques associées. Cependant, les principaux mécanismes cellulaires et moléculaires à la base d'un tel dysfonctionnement neuronal sont en grande partie inconnus. Ainsi, la découverte de ces mécanismes neuronaux exacts pourrait représenter un premier pas vers la génération de stratégies thérapeutiques nouvelles et efficaces capables de réduire l'obésité chez les enfants. Dans ce projet, nous allons caractériser les principaux facteurs moléculaires altérés dans l'hypothalamus de souris nouveau-nées issues de mères exposées à un régime hypercalorique pendant l'allaitement. Notre projet pourrait nous aider à mieux comprendre les principaux mécanismes cellulaires et moléculaires qui expliquent pourquoi les mères obèses sont plus susceptibles de donner naissance à des enfants obèses.

Pour atteindre cet objectif, nous utiliserons un maximum de 288 souris sur 5 ans. La souris est le modèle de choix pour notre projet car elle permet d'étudier des individus génétiquement modifiés dont la physiologie générale est suffisamment proche de celle de l'homme. Ainsi, nous pourrions obtenir des informations pertinentes sur le plan médical. De plus, les mécanismes biologiques étudiés (poids corporel et régulation de la glycémie) impliquent un processus de communication entre le cerveau et le reste du corps. Un tel processus de communication est crucial pour la régulation de l'appétit, du taux de sucre dans le sang et du stockage des graisses. Par conséquent, il est absolument nécessaire d'étudier un organisme vivant entier et aucune méthode *in vitro* ou *in silico* ne peut remplacer nos modèles murins. Conformément au principe des 3R, nous avons optimisé les protocoles afin de minimiser le nombre de souris utilisées et avons affiné leur utilisation. Des tests statistiques de puissance ont été utilisés pour prévoir soigneusement le nombre d'animaux nécessaires pour obtenir des résultats statistiquement fiables. Une attention particulière sera accordée au bien-être des animaux. Toutes les procédures proposées sont conformes aux directives française et européenne 2010/63 / UE et respectent les normes de protection et de bien-être des animaux température et hygrométrie régulées et raffinement avec enrichissement des cages pour améliorer les conditions de logement.

14581 L'intestin est l'une de nos plus larges surfaces d'échange avec le milieu extérieur. Les animaux s'exposent à des toxines et des poisons qui peuvent contaminer la nourriture. Nous avons découvert chez la mouche du vinaigre une nouvelle réponse des cellules intestinales (les entérocytes) : l'exposition à des toxines bactériennes formant des pores ou à des substances xénobiotiques comme la caféine, l'alcool, les ions métalliques, ou le paraquat, substance très fortement oxydante employée comme herbicide, conduit à une extrusion ou purge du contenu cellulaire (le cytoplasme et des organelles endommagées), sans tuer les cellules, ce qui pourrait aussi éliminer le produit toxique. Il en résulte un épithélium intestinal aminci. Les entérocytes récupèrent ensuite leur épaisseur et morphologie initiales en 6 à 9 heures. Cette réponse permet de protéger les cellules intestinales des effets néfastes de l'exposition occasionnelle à des substances toxiques chimiques ou microbiennes présentes dans de la nourriture contaminée. Nous avons démontré chez la mouche du vinaigre que ce mécanisme de protection des cellules intestinales implique plusieurs

protéines, dont la cycline J, protéine conservée au cours de l'évolution entre les différentes espèces animales, et dont la fonction était jusqu'à présent inconnue.

Nos premières données ont établi que des cellules intestinales humaines en culture réagissent de manière similaire à l'épithélium de la mouche lorsqu'elles sont mises en présence de toxines bactériennes : un amincissement est rapidement observé, suivi d'une phase rapide de récupération. Nous émettons ainsi l'hypothèse que le mécanisme de purge cytoplasmique couplé à une récupération rapide est un mécanisme évolutivement conservé.

Ce projet a pour but de déterminer dans quelle mesure ces résultats sont transposables dans un modèle mammifère, la souris en l'occurrence, qui possède un épithélium intestinal plus complexe (avec la présence d'autres types cellulaires) et un microenvironnement plus proche de celui de l'homme que la mouche.

Nous chercherons ainsi à démontrer que ce même mécanisme est observé *in vivo*, chez la souris, après exposition à des toxines bactériennes ou des xénobiotiques (alcool, caféine, ions métalliques...), et ce dans un environnement plus complexe avec des interactions cellulaires et un microenvironnement intestinal qui n'existe qu'*in vivo*.

Cette étude permettra de mieux comprendre la réaction de l'organisme à des xénobiotiques (par exemple, les études de l'effet de la caféine portent sur le système nerveux, mais rarement sur les cellules intestinales) et de mettre en évidence d'autres rôles protecteurs de la barrière intestinale. Si ces mécanismes sont défectueux chez des patients, ceux-ci pourraient être plus sensibles à des infections ou des intoxications, ou encore être sujets à des maladies inflammatoires. En outre, on sait que les nourrissons des pays en voie de développement ingèrent des sols contaminés, d'où une diminution de la croissance. Ces travaux sur la biologie intestinale après infection bactérienne ou ingestion de xénobiotiques pourraient ainsi se traduire à long terme par des applications médicales ou de meilleures prises en charge des interactions de l'homme avec son environnement.

Remplacer Des expériences ont été réalisées préalablement chez la mouche du vinaigre afin de définir les conditions optimales, ainsi qu'*in vitro* dans un modèle cellulaire d'épithélium humain (cellules Caco-2).

Réduire Nous envisageons l'utilisation de 10 souris par point d'expérience, nombre suffisant afin d'obtenir des résultats significatifs du point de vue statistique.

Raffiner Le modèle murin est choisi dans le but de reproduire le plus fidèlement possible les infections étudiées chez la mouche. Les conditions de travail seront raffinées afin de limiter l'angoisse, l'inconfort, le stress et la douleur associées aux procédures expérimentales. L'injection de toxines bactériennes ou de xénobiotiques sera réalisée de façon contrôlée et de façon à ne pas être dommageable à l'animal (doses minimales, temps de contact relativement courts).

Un nombre total de 290 animaux d'expérimentation est envisagé pour l'ensemble des conditions (exposition aux toxines bactériennes ou aux xénobiotiques)

14582 Streptococcus suis est une bactérie zoonotique répandue dans les élevages porcins où elle est responsable de graves affections (méningite, septicémie, inflammation de membranes séreuses) pouvant entraîner des pertes économiques importantes réduction des performances zootechniques des animaux affectés, détérioration de la qualité des carcasses, élévation du taux de pertes et de saisies à l'abattoir, etc. Le contrôle et la prévention de l'infection sont généralement difficiles. En élevage, l'antibiothérapie constitue un élément essentiel de l'arsenal thérapeutique mais son utilisation est limitée afin de ne pas contribuer à aggraver les problèmes liés à la résistance aux antibiotiques. Une des méthodes alternatives repose sur la vaccination. Cependant aucun vaccin commercial n'est actuellement disponible en France et donc l'usage d'autovaccins est autorisé. Les autovaccins sont préparés à partir de germes pathogènes isolés d'un sujet infecté en élevage et ils sont destinés à être administrés aux animaux malades ou sains de cet élevage. Les autovaccins sont ainsi utilisés pour prévenir les infections à S. suis chez les truies ou les porcelets, même si peu de données sont disponibles quant à leur efficacité. De plus, aucune étude n'a été conduite pour évaluer l'impact des autovaccins sur le portage de S. suis sur les amygdales des animaux (connu comme pouvant être à l'origine de nouveaux foyers infectieux).

L'objectif de cette expérimentation est d'étudier l'impact d'autovaccins à *S. suis*, administrés aux truies (1) sur le portage amygdalien de *S. suis* chez les truies et leur descendance, (2) sur la réponse immunitaire des truies et de leurs porcelets vis à vis de *S. suis* et (3) sur la protection des porcelets vis à vis de la maladie. Cette étude permettra également de valider les nouvelles méthodes mises en place au laboratoire pour quantifier *S. suis* dans les tissus atteints ainsi que de disposer de sérums de porcs positifs en anticorps vis-à-vis de *S. suis*.

L'étude fera l'objet de 2 procédures expérimentales

- La première sera conduite sur deux jeunes truies, de 36 semaines d'âges et exemptes d'organismes pathogènes spécifiés (EOPS), afin d'évaluer le pouvoir pathogène de la souche de *S. suis* et sa capacité à coloniser les amygdales.

- La seconde procédure sera menée avec quatre groupes de deux truies EOPS (de 43 semaines d'âge) ainsi que 10 de leurs porcelets (jusqu'à 9 semaines d'âge) (au total 8 truies et 80 porcelets). Les groupes seront constitués de truies non infectées et non vaccinées (groupe 1), non infectées et vaccinées (groupe 2), infectées et non vaccinées (groupe 3) ou infectées et vaccinées (groupe 4). Les truies seront suivies jusqu'au sevrage des porcelets. Les truies des groupes 2, 3 et 4 seront euthanasiées dans la semaine suivant le sevrage de leurs porcelets alors que les truies du groupe 1 seront conservées dans l'élevage protégé fournisseur. Dans chacun des groupes, 10 porcelets (5 porcelets par truie) seront inoculés avec la souche de *S. suis* et 10 porcelets (5 porcelets par truie) recevront du diluant stérile (à 6 semaines d'âge). Les porcelets seront suivis jusqu'à 9 semaines d'âge.

Les animaux seront observés quotidiennement afin de détecter, le plus précocement possible, des comportements anormaux et des signes cliniques (hypo/hyperthermie, signes nerveux, perte d'appétit ou de poids, etc). Une surveillance immunitaire hebdomadaire des truies et des porcelets sera également réalisée via des prises de sang. Des prélèvements amygdaliens seront collectés et analysés par culture et Q-PCR, ciblant *S. suis*.

L'infection expérimentale avec *S. suis*, est généralement symptomatique chez les porcelets de 6 semaines (hyperthermie, signes nerveux). Des variabilités ont précédemment été observées en fonction de la souche, de l'âge à l'inoculation et des individus. C'est pourquoi dans cette étude expérimentale, il nous paraît indispensable d'évaluer le pouvoir pathogène de la souche étudiée chez les jeunes truies lors d'une procédure préliminaire (procédure 1). Le plan expérimental de la procédure 2 sera donc si besoin révisé en fonction des résultats de la procédure 1. Dans les cas où l'infection conduirait à une altération importante de l'état de santé, les animaux concernés seront traités (administration d'anti-inflammatoire et d'antibiotique) voire euthanasiés si leur état le nécessite.

Ce protocole expérimental est pensé de façon à minimiser le nombre de porcs utilisés tout en menant une étude suffisamment robuste pour avoir des résultats statistiquement significatifs. Il est en effet indispensable d'avoir au minimum cinq porcelets par truie pour considérer la variabilité inter-individuelle des animaux et pour avoir une pression d'infection suffisante pour reproduire une colonisation des amygdales et/ou la maladie. Les porcelets seront élevés en groupe stable, disposeront d'objets manipulables et de lampes chauffantes ainsi que de plaques de couchage. Ils auront accès à de l'eau et à l'alimentation à volonté. Il n'existe pas d'alternative à cette étude expérimentale sur l'animal dans la mesure où nous cherchons à évaluer l'état de santé général de l'animal cible qu'est le porc ainsi que ses réponses immunologiques.

14583 Le but de notre équipe est de créer et/ou de caractériser des modèles animaux de maladies musculaires humaines (myopathies) et de tester l'éventuelle amélioration du phénotype grâce à différentes approches de thérapie génique. Notre travail est principalement axé sur les maladies génétiques affectant les muscles, ces pathologies impliquent notamment une perte de la force musculaire et potentiellement une paralysie progressive des membres. Pour comprendre comment les mutations génétiques sont responsables de ces pathologies, nous avons dans un premier temps utilisé des modèles cellulaires. Nous planifions maintenant d'utiliser des souris pour comprendre à la fois la physiologie et la pathophysiologie dans un organisme vivant. Dans le but de mieux

comprendre les fonctions des protéines impliquées dans ces pathologies et leurs interactions, nous prévoyons d'utiliser 4 modèles murins pour les myopathies congénitales et 1 lignée de souris saines. Les modifications génétiques chez les souris nous permettent d'étudier les pathologies humaines, et de mieux comprendre leur développement. Nous appliquerons nos approches de thérapies géniques et analyserons les souris sur leurs capacités physiques et leurs force musculaire via différents tests d'aptitudes pour mesurer l'amélioration des symptômes myopathiques tels que l'endurance, la force brute, la coordination etc Des études cellulaires ont été effectuées au préalable afin de réduire au maximum le nombre d'animaux. En revanche, seul un organisme entier permet d'étudier d'une part la physiopathologie et d'autre part l'amélioration des symptômes en testant des thérapies. Le modèle animal choisi est la souris car nous avons généré des animaux portant les mutations responsables des myopathies (REPLACEMENT). Plusieurs procédures expérimentales (maximum une/jour) seront réalisées chez les mêmes souris, pour réduire le nombre total de souris. Le traitement sera injecté par voie intramusculaire dans un muscle de la patte de la souris. Une seule patte sera injectée, l'autre patte servira de contrôle. Ainsi chaque animal sera son propre contrôle et cela permet de réduire le nombre d'animaux (REDUCTION). Les souris seront surveillées quotidiennement. Tout signe de douleur sera pris en charge en prenant les mesures appropriées en fonction du niveau de douleur observé, soit un analgésique sera administré, soit les animaux seront retirés de l'étude, prématurément si nécessaire. Le suivi de nos souris inclut une observation du comportement général (perte de poids, apathie, yeux fermés) et de la paralysie des membres postérieurs. Pour les souris qui ont des difficultés pour manger de la nourriture solide (croquettes), de la nourriture en gel sera déposée dans la litière de la cage. Les procédures expérimentales seront faites sous anesthésie générale pour éviter tout inconfort ou douleur pouvant en découler. Les souris seront placées sur une plaque chauffante à 37C pour éviter une hypothermie et de l'ocrygel sera appliqué pour prévenir tout dessèchement oculaire (RAFFINEMENT).

Nous réaliserons dans un premier temps une pré-étude pour déterminer la meilleure voie d'injection et le meilleur vecteur pour obtenir la meilleure diffusion du traitement.

Nous utiliserons ces résultats pour les deux types de cohortes prévues pour ce projet

- Les cohortes de type A seront injectées systémiquement avec le vecteur. Les souris passeront par des tests phénotypiques musculaires pour évaluer l'efficacité du traitement, puis la force musculaire sera analysée directement au sein du muscle.

- Les cohortes de type B seront injectées intramusculairement dans le muscle Tibialis Anterior où l'expression du vecteur sera confinée. Les deux pattes seront injectées soit avec le traitement soit avec le contrôle puis la force musculaire sera analysée directement au sein du muscle.

Un maximum de 2250 souris seront utilisées.

14584 L'intestin met en jeu des communications complexes entre le microbiote, les cellules de l'épithélium et le système immunitaire afin de maintenir l'intégrité de la barrière intestinale et exercer son rôle de défense contre des agents pathogènes. Un déséquilibre de la composition du microbiote (ou dysbiose) est une caractéristique de différentes pathologies comme les maladies inflammatoires, le diabète ou encore le cancer, et représente une piste intéressante pour mieux comprendre l'origine de certaines maladies.

Les maladies inflammatoires chroniques du système digestif (MICI) comme la maladie de Crohn ou la colite ulcéreuse sont associées à une inflammation de la paroi du tube digestif provoquée par une hyperstimulation du système immunitaire digestif. L'incidence des MICI est en hausse dans les pays industrialisés et met en jeu des facteurs génétiques, auto-immuns et environnementaux, cependant les causes de l'inflammation restent à identifier. De façon intéressante, il est clair qu'une dysbiose semble jouer un rôle dans l'initiation et le développement de l'inflammation, mais les mécanismes impliqués sont encore mal compris.

Nous avons récemment mis en évidence que les cellules tuft, qui jouent un rôle de sentinelles contre les agents pathogènes, sont capables de sentir des composés d'une dysbiose et de déclencher une réponse immunitaire qui conduit à un contexte inflammatoire chronique, créant ainsi

un cercle vicieux. Les réponses immunitaires observées à partir de prélèvements de patients varient en fonction du stade de la maladie et des traitements, et sont probablement très plastiques. Les objectifs de ce projet sont d'évaluer, à l'aide d'un modèle murin reproduisant les atteintes de la maladie de Crohn 1/ les réponses inflammatoires mises en jeu au cours de l'évolution de la maladie, à des stades très précoces puis lorsque la maladie est installée 2/ le rôle des cellules tuft dans l'établissement et la progression de la maladie.

Ce projet requiert une analyse intégrée des communications qui existent entre l'épithélium intestinal, les cellules du système immunitaire et le microbiote. Cette approche de physiologie intégrative sera menée à l'aide de 3 lignées de souris transgéniques, soit un total d'animaux estimé à 1500 souris, sur une durée totale de projet de 5 années. Notre démarche s'inscrit dans le respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 (« règle des 3R »). Aucune méthode alternative ne permet actuellement de reproduire les interactions entre le microbiote, l'épithélium intestinal et les cellules immunitaires, ce projet nécessite donc l'utilisation de modèles intégrés tels que des modèles murins transgéniques. Afin de réduire le nombre d'animaux, le minimum requis sera utilisé pour obtenir des résultats statistiquement interprétables, et les élevages seront utilisés au mieux puisque les études seront menées sur des mâles et femelles, et la majorité des génotypes produits seront utilisés. Par ailleurs, certaines procédures seront menées de façon longitudinale en fonction de l'évolution de la maladie, afin de réduire le nombre d'animaux. Les animaux feront l'objet d'une surveillance régulière par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié de l'animalerie. Afin de réduire au maximum la douleur et l'angoisse que certains protocoles pourraient engendrer chez les animaux, des points limites ont été définis. En cas de signes de détresse ou de douleur, d'atteinte d'un point limite, en accord avec le personnel qualifié, le protocole sera stoppé pour ces animaux qui seront euthanasiés et autopsiés. Tous les animaux auront à leur disposition de la boisson et de la nourriture à volonté, et leur milieu sera enrichi à l'aide de carrés de coton pour la construction d'un nid, ainsi que de litière mélangée à des copeaux.

14585 Les diarrhées d'origine infectieuse sont une des principales causes de morbidité et mortalité infantile avec plus de 500,000 décès par an dans le monde, notamment dans les pays à faible revenu. Parmi les multiples agents infectieux, le rotavirus représente une des principales causes de gastro-entérite grave et déshydratante chez les enfants de moins de cinq ans et, malgré l'introduction mondiale de la vaccination, ces infections entraînent encore plus de 200,000 décès chaque année. Les vaccins actuellement utilisés sont tous des vaccins vivants atténués administrés par voie orale, constitués de souches « affaiblies » de rotavirus infectieux, encore capables de se répliquer pour induire une réponse immunitaire chez l'hôte, mais sans engendrer aucune pathologie. Même si ces vaccins offrent une excellente protection dans les pays développés, ils sont moins efficaces dans les pays en voie de développement, pour des raisons encore méconnues. De plus, comme tous les vaccins vivants, ils ne peuvent pas être administrés aux sujets immunodéprimés. Pour ces raisons, plusieurs groupes de recherche continuent à explorer des stratégies de vaccination alternatives, pour mettre au point des vaccins non-vivants à base de rotavirus inactivé ou de protéines virales recombinantes (en termes simples, des morceaux de virus « fabriqués » en laboratoire). Cependant, pour avancer sur cette voie, il est nécessaire de comprendre comment induire une réponse immunitaire efficace au niveau de la muqueuse intestinale, qui représente le site d'infection principal du rotavirus.

En effet, le système immunitaire de l'intestin, comme celui d'autres muqueuses, est en quelque sorte « séparé » du reste du système immunitaire, car les lymphocytes (les globules blancs qui protègent un individu vacciné vis-à-vis d'une infection microbienne spécifique) ne peuvent accéder à la muqueuse intestinale que s'ils sont équipés, à leur surface, de certaines molécules, appelées « récepteurs d'adressage ». Ces récepteurs, dans leur ensemble, constituent une sorte de « GPS moléculaire » qui aiguille certains lymphocytes vers l'intestin grêle et d'autres, par exemple, vers la peau. Parmi ces récepteurs, ceux qui sont nécessaires à la localisation intestinale sont présents seulement sur les lymphocytes qui ont été activés par des microbes ou des vaccins qui ont accédé à l'organisme à travers la muqueuse intestinale, souvent après contamination ou administration par voie orale. Au contraire, les lymphocytes activés lors d'une immunisation par voie intra-musculaire

ou sous-cutanée, qui sont néanmoins parmi les voies de vaccination les plus utilisées, ne sont pas équipés des récepteurs adéquats pour se localiser et engendrer une réponse immunitaire au niveau intestinale. Pour cette raison, jusqu'à présent, tous les vaccins efficaces contre les infections intestinales sont des vaccins administrés par voie orale.

Cependant, si la voie orale est appropriée pour les vaccins vivants atténués, les vaccins non-vivants, à base de protéines recombinantes, peuvent difficilement être administrés par cette voie, car les protéines sont normalement dégradées par les enzymes digestives. Toutefois, le système immunitaire associé aux muqueuses fonctionne de façon relativement indépendante du reste du système immunitaire et les lymphocytes activés au niveau d'une muqueuse ont tendance à migrer à nouveau dans des tissus muqueux, pour y exercer leurs fonctions effectrices, mais pas exclusivement dans la muqueuse d'origine. En effet, il est connu qu'une vaccination administrée par voie intra-nasale induit une réponse immunitaire non seulement dans les voies respiratoires, mais aussi dans la muqueuse vaginale, une immunisation intra-rectale entraîne une réponse non seulement au niveau du côlon mais aussi de l'intestin grêle, tandis qu'une immunisation orale induit la production d'anticorps dans l'intestin et les glandes mammaires, mais pas dans le tractus génital. Ces exemples montrent qu'il est donc possible d'évoquer une réponse immunitaire au niveau d'une muqueuse tout en administrant le vaccin sur une autre, mais à condition de suivre certaines "règles", pas encore entièrement élucidées, dictées par les molécules d'adressage qui sont exprimées sur les lymphocytes.

Ce projet a donc pour objectif d'évaluer quelle est la meilleure stratégie pour induire une réponse immunitaire efficace au niveau de l'intestin grêle en immunisant des souris avec un vaccin expérimental constitué de protéines virales recombinantes de rotavirus, administrées par différentes voies muqueuses. Nous analyserons ainsi les récepteurs d'adressage sur certaines populations lymphocytaires (notamment sur les lymphocytes B mémoires), ainsi que leur distribution au niveau des différents organes. Les animaux immunisés seront ensuite infectés avec du rotavirus, pour estimer l'efficacité de la vaccination.

Ce genre d'études sur le système immunitaire ne peut être réalisé que sur des animaux vivants, car il est impossible d'induire une réponse immunitaire et d'étudier la distribution des lymphocytes au niveau des organes sur un système cellulaire *in vitro*. De plus, l'évaluation de l'efficacité d'un vaccin antiviral nécessite de reproduire les interactions entre le système immunitaire et les organes infectés, et cela est possible seulement grâce à des expériences *in vivo*.

Pour ce projet nous envisageons d'utiliser environ 500 souris sur cinq ans, une estimation basée sur notre précédente expérience dans ce type d'études. Les animaux seront hébergés, en groupes sociaux, dans un environnement adapté, et des « jouets » pour l'enrichissement du milieu seront toujours présents dans chaque cage. Les procédures d'immunisation avec des protéines virales recombinantes seront réalisées sous anesthésie générale. Ces procédures sont généralement bien tolérées et provoquent peu ou pas de souffrance chez les animaux. L'infection à rotavirus est asymptomatique chez la souris adulte et la protection conférée par le vaccin sera déterminée en évaluant l'excrétion de virus dans les selles.

Cette étude permettra non seulement d'avancer dans la mise au point d'un vaccin non-vivant contre l'infection à rotavirus, mais aussi de mieux comprendre certains mécanismes qui gouvernent l'immunité au niveau des muqueuses.

14586 Le staphylocoque doré ou *Staphylococcus aureus* est l'une des bactéries le plus fréquemment rencontrée en pathologie humaine, responsable d'infections graves, notamment pulmonaires. *Pseudomonas aeruginosa* est une autre bactérie qui est, elle, à l'origine d'infections pulmonaires autrement appelées pneumonies notamment chez les patients atteints de mucoviscidose. Ces deux bactéries ont pour autre point commun d'être fréquemment résistantes aux antibiotiques habituellement utilisés. Le besoin de développer de nouveaux antibiotiques n'a donc jamais été aussi criant.^[1]_[SEP]

De nouveaux antibiotiques, dits « peptidiques », ont été développés récemment. Les premiers travaux réalisés ont montré une efficacité importante de ces peptides sur *Staphylococcus aureus* et

Pseudomonas aeruginosa dans des modèles d'infection cutanée ou de septicémie chez les souris. Les infections pulmonaires survenant chez les patients fragiles, notamment atteints de mucoviscidose, sont souvent provoquées par ces deux bactéries mais dans leur forme multirésistante, avec des conséquences graves en santé humaine. Evaluer de nouveaux antibiotiques dans un modèle de pneumonies chez la souris est donc particulièrement important. Nous souhaitons évaluer les « peptides antimicrobiens » dans un modèle de pneumonie chez la souris, ce qui n'a encore jamais été fait. Notre hypothèse est que l'administration de peptides antimicrobiens serait un meilleur traitement des pneumonies provoquées par des germes dits multirésistants comme le staphylocoque doré ou *Pseudomonas aeruginosa* chez la souris, en comparaison aux traitements habituellement utilisés.

La première phase de notre étude consistera donc à administrer par voie inhalée la bactérie qui sera à l'origine de l'infection pulmonaire. Les souris seront placées dans une cage hermétique dans laquelle sera diffusée des bactéries suspendues dans l'air. Elles respireront normalement et aucune contention ni contact avec la souris ne sera nécessaire pour cette phase. Après 24 heures, nous traiterons les souris, soit par peptides antimicrobiens, soit par antibiothérapie classique. Nous évaluerons la réponse clinique (l'apparence, l'expression faciale, la réactivité, le poids et la température) en comparant les souris tests aux souris témoins. Cette étude sera placée sous la règle des 3R qui consiste à 1) « Remplacer » aucune autre alternative n'étant suffisamment pertinente ni possible pour évaluer la toxicité et l'efficacité des antibiotiques. L'utilisation de ce modèle animal se justifie pour reproduire ce qui se passe en pratique clinique humaine. 2) « Réduire » au minimum le nombre de souris utilisé (n=1680) pour ne pas exposer un nombre inutilement trop important d'animaux à l'expérimentation tout en garantissant une validité statistique aux résultats obtenus. 3) « Raffinement », avec un environnement des souris qui sera enrichi pour améliorer au maximum le bien-être animal, un nombre de souris qui sera limité par cage, des conditions dans les cages qui seront identiques à celle de l'élevage, un suivi quotidien des souris et des conditions d'expérimentation évitant au maximum la souffrance animale, notamment par le biais d'anesthésie pour les procédures le nécessitant. Le tout sera réalisé par un personnel formé à l'expérimentation animale.

En raison des difficultés existant actuellement pour traiter les infections respiratoires des patients, tout particulièrement ceux atteints de mucoviscidose, cet essai ouvrira la voie à de nouveaux traitements antibiotiques chez l'homme.

14587 Depuis plusieurs années, la demande en produits carnés et notamment en viande de porc augmente au niveau mondial. Cela induit une forte pression de production pour les professionnels de l'industrie porcine. Cependant, les productions porcines sont responsables de rejets d'effluents néfastes pour l'environnement. Un des leviers d'action pour répondre à ces enjeux est d'augmenter la productivité des truies ainsi que la survie et la croissance des porcelets entre la naissance et le sevrage. Les objectifs de ce projet de recherche sont d'élaborer des stratégies nutritionnelles pour à la fois augmenter le nombre de porcelets nés vivants par truie par an (prolificité des truies) mais aussi pour améliorer la survie et la croissance des porcelets pendant le développement utérin, la lactation mais également sur le long terme. Ces stratégies devront être envisageables sur le terrain d'un point de vue technicoéconomique. Deux procédures expérimentales seront mises en place afin d'étudier d'une part, l'influence de divers facteurs sur la prolificité des truies et leurs performances de lactation (« procédure truie ») et, d'autre part, l'influence de ces divers facteurs sur la capacité de survie des porcelets (« procédure porcelets »). La procédure expérimentale concernant les truies inclura des possibilités d'alimentation avec des régimes carencés, des modifications des conditions environnementales (variation de la température et de l'humidité), des administrations individuelles per os de produits variés (bolus, microalgues, probiotiques...) autorisés ou non au niveau communautaire, des prises de sang et des prélèvements de colostrum et de lait. La procédure concernant les porcelets inclura des possibilités d'alimentation avec des aliments sous la mère carencée, des modifications des conditions environnementales (variation de la température et de l'humidité) puisqu'ils seront hébergés avec les truies, des administrations individuelles per os de produits variés (bolus, microalgues, probiotiques...) autorisés ou non au niveau communautaire,

des prises de sang et des prélèvements de fèces. Ce projet sera réalisé chez le porc, et plus particulièrement la truie et le porcelet puisqu'il s'agit des stades physiologiques d'intérêt. En effet, il existe des spécificités d'espèce ainsi que de stade physiologique notamment sur les mécanismes de régulation physiologiques (endocrinologie, métabolisme) et les besoins nutritionnels des animaux. Ainsi, la complexité de ces paramètres et de leurs interactions ne permet pas d'utiliser des modèles alternatifs (modélisation, études *in vitro*). Le projet qui aura une durée de 5 ans, inclura 10 essais (soit 2 par an) qui comprendront chacun en moyenne 60 truies. Les porcelets issus de ces truies du projet pourront, ou non, être également inclus dans ce projet. Au total, 10 essais pourront impliquer des porcelets (environ 200 porcelets par essai provenant au maximum des 60 portées). Cela représentera 600 truies et 2000 porcelets pour la totalité du projet. Ainsi, pour un essai donné, soit uniquement les truies seront utilisées, soit uniquement les porcelets, soit les truies et les porcelets. Les truies et les porcelets seront toutefois placés dans des conditions d'hébergement similaires à celle des animaux d'élevage élevés dans un but commercial et resteront dans la filière reproduction pour les truies et partiront dans la filière de consommation pour les porcelets. Ainsi, la majorité des animaux partiront dans le circuit de consommation. Les truies ou les porcelets qui recevront des additifs sans agrément/autorisation seront écartés de la filière de consommation et seront donc euthanasiés sauf si une dérogation est obtenue. L'alimentation d'une truie avec un produit non autorisé pourra entraîner l'euthanasie de ses porcelets sauf contre-indication. À la fin de chaque essai, les porcelets rejoindront les salles de post-sevrage de l'établissement utilisateur et seront élevés classiquement avec les autres animaux de l'élevage jusqu'à leur abattage. Les truies continueront leur cycle reproductif et pourront à nouveau entrer dans une procédure expérimentale. Pour chaque acte pouvant engendrer une souffrance, le nombre d'animaux utilisés sera estimé afin de réaliser l'acte sur le nombre minimal d'individus. D'autre part, plusieurs méthodes seront mises en œuvre afin de réduire la souffrance ou le stress appliqué à ces animaux. Par exemple, le nombre de tentatives pour les prélèvements de sang et de fèces sera limité à 3 par animal afin de limiter la douleur, le temps de contention et donc le stress ressenti par les animaux. Un animal dont l'état de santé se dégrade en cours d'essai pourra également être exclu du dispositif expérimental et des soins lui seront prodigués afin qu'il retrouve un état de santé optimal rapidement. En outre, à partir du 28^e et jusqu'au 107^e jour de gestation, les truies sont logées collectivement, ce qui leur permet d'avoir des interactions sociales. Les loges de gestation sont également enrichies d'un ballon.

14588 Les infections osteo-articulaires sont des infections bactériennes difficiles à guérir. Leur traitement nécessite d'associer un geste chirurgical à un traitement antibiotique optimal administré de façon prolongée. A ce jour les études cliniques comparant l'efficacité des traitements antibiotiques sont quasi inexistantes et la plupart des données viennent des modèles expérimentaux.

Nous avons développé un modèle d'osteomyélite chronique et un modèle d'infection sur prothèse chez le lapin Néo-Zélandais qui nous permet de comparer l'efficacité de différents traitements antibiotiques.

Dans ce travail nous évaluerons

l'efficacité des antibiotiques seuls et en association dans un modèle d'infection sur prothèse à streptocoques, bactérie de plus en plus fréquente en pathologie humaine

l'efficacité des antibiotiques seuls et en association dans un modèle d'osteomyélites à entérobactéries multirésistantes aux antibiotiques, qui sont aussi de plus en plus fréquemment rencontrées en raison de l'augmentation importante de la résistance aux antibiotiques dans le monde.

Notre équipe a une expérience de plus de 10 ans sur l'utilisation de ces modèles animaux. Ceci est nécessaire dans notre domaine d'étude car l'os est un tissu vivant complexe qui ne peut être reproduit *in vitro* et ceci est encore plus vrai du comportement des jonctions entre l'os et des prothèses. Nous comparons habituellement entre eux et à des animaux d'un groupe contrôle plusieurs agents anti-microbiens ce qui permet d'économiser des groupes contrôles. La taille des groupes est au minimum de 12 animaux car en médecine, l'évaluation de la variabilité de la réponse est une information capitale. Dans notre expérience, les animaux supportent sans manifester de

douleur de manière inacceptable. A titre préventif nous les traitons avec des opioïdes de niveau III (Fentanyl) pendant 3 jours post-opératoires et les surveillons de manière renforcée pendant cette phase.

Sur les 5 années du projet, nous envisageons de traiter 14 groupes (contrôle compris) soit un total de 168 animaux au maximum.

14589 L'accident vasculaire cérébral (AVC) ischémique est la 1^{ère} cause de handicap acquis chez l'homme, la 2^{ème} cause de démence et la 3^{ème} cause de mortalité en France. Il survient lorsqu'une artère du cerveau se bouche par un caillot sanguin entraînant ainsi un arrêt de la circulation sanguine dans une partie du cerveau. Si l'artère n'est pas débouchée en urgence par l'équipe médicale, cela va rapidement engendrer la destruction d'une zone du cerveau à l'origine d'un handicap lourd (paralysie, trouble du langage et de la vision) ou du décès du patient.

Grâce au débouchage de l'artère par un procédé médicamenteux ou mécanique réalisé aujourd'hui en urgence dans les services de neurologie vasculaire, le nombre de patients invalides après un AVC ischémique a considérablement diminuées. Malgré ces progrès, les délais de prise en charge restent longs laissant s'installer, jusqu'au débouchage de l'artère, des dommages irréversibles pour le cerveau à l'origine d'un handicap irréversible pour le patient.

Nous proposons dans le cadre de cette étude pré-clinique chez la souris de démontrer la capacité d'un complément alimentaire à protéger le cerveau jusqu'à ce que l'artère puisse être débouchée médicalement. Présent naturellement chez l'homme, ce complément alimentaire en solution évalué comme non nocif, sera administré à l'animal par voie orale. Ensuite, une artère du cerveau de la souris sera bouchée transitoirement par un fil de nylon par un chirurgien vasculaire qualifié sous anesthésie générale. Cette procédure chirurgicale est reconnue pour reproduire au mieux le modèle d'AVC humain chez la souris. Elle provoque l'apparition d'une hémiparésie indolore. L'animal sera sacrifié 3 heures après afin de mesurer le volume de la zone définitivement détruite par l'AVC. Le volume du tissu cérébral détruit sera comparé dans trois groupes de souris. Le premier groupe recevra le composé avant la procédure chirurgicale (40 souris), le deuxième groupe recevra une solution contrôle d'eau salée (40 souris). Le troisième groupe est composé de souris génétiquement modifiées (KO) connu pour être carencé en ce composé étudié (40 souris). Ces souris KO ne présentent aucune conséquence de cette carence jusqu'à un âge avancé. La variabilité entre les animaux de l'étendue initiale de l'AVC provoqué lors de la procédure chirurgicale est évalué à 18% (taux de succès de 80%). Un contrôle qualité de l'étendue initiale de l'AVC par imagerie scintigraphique est utilisé dans une logique de remplacement d'une procédure ayant nécessité le sacrifice d'autres animaux pour une mesure histologique de ce paramètre. De plus, elle permettra d'intégrer cette variable dans nos calculs. Ainsi, il nous sera possible de réduire considérablement le nombre d'animaux nécessaires pour obtenir des résultats significatifs. Un effectif total de 238 souris C57BL/6 maximum (198 WT et 40 KO) a été statistiquement calculé comme nécessaire pour cette étude pré-clinique. Cet effectif tient compte d'une étape préalable de vérification de la dose à administrer chez la souris issue de données de la littérature chez l'homme. Une approche séquentielle nous permet de réduire là-encore le nombre d'animaux nécessaire (68 animaux maximum). L'effectif total des animaux tient également compte d'un maximum de 50 souris requis pour permettre au chirurgien de se familiariser avec le modèle animal. Toutefois, dès 5 réussites consécutives de la procédure chirurgicale la phase de l'apprentissage du chirurgien sera considérée comme terminée. Notre calcul a été réalisé sur la base d'une réduction de 15 à 20% du volume de cerveau détruit en utilisant le composé alimentaire et une majoration de 15 à 20% chez les souris KO carencées en ce composé vis-à-vis de nos souris contrôles.

La durée totale de l'expérience est d'environ 5 heures. L'hémiparésie chez l'homme est indolore mais d'éventuelles douleurs liées à l'acte chirurgical pendant cette période avant l'euthanasie de l'animal sont couvertes par l'administration d'analgésiques. Les éléments de raffinements ont été définis. Pendant la durée totale de la procédure, les animaux sont gardés sous observation permanente permettant de soulager rapidement l'animal dès l'apparition de signes de souffrance. Après l'intervention, les souris hémiparésiques sont isolées et placées sur tapis chauffant et moelleux (cellulose) dans un environnement calme avec lumière tamisée. Une fiche d'observation incluant

une évaluation neurologique sera remplie pour chaque animal. Elle définit les traitements adéquats en cas de souffrance et les points limites à respecter strictement. L'élevage des souris se déroule dans une animalerie agréée, dans un environnement enrichi (présence de maisonnettes, de buchettes en bois et de morceaux de coton pour la construction de nids) avec un nombre maximal de 4 animaux par cage et nourriture et boisson à volonté. La durée totale du projet n'excèdera pas 3 ans.

14590 Dans son rapport présenté en Février 2017, l'Organisation Mondiale de la Santé lance l'alerte sur le nombre insuffisant de nouveaux antibiotiques en développement et la menace croissante de la résistance aux antimicrobiens. Elle publie également sa première liste « d'agents pathogènes prioritaires », hautement résistants aux antibiotiques, énumérant les familles de bactéries les plus menaçantes pour la santé humaine. En tête de liste de la catégorie « critique » se trouvent les bactéries du genre *Acinetobacter* spp, et en particulier l'espèce *Acinetobacter baumannii*. C'est un pathogène fréquemment associé aux infections nosocomiales (acquises en milieu hospitalier), telles que les pneumonies sévères acquises sous ventilation chez les patients de réanimation ou immunodéprimés. *Acinetobacter baumannii* est le plus souvent résistant à un grand nombre d'antibiotiques, y compris les carbapénèmes, qui constituent l'une des dernières lignes de traitement actuellement disponible (51% de résistance aux carbapénèmes en 2010 et jusqu'à 80% de résistance dans certains pays européens). De ce fait, les infections à *Acinetobacter baumannii* sont grevées d'une mortalité hautement significative, à hauteur de 40%.

Par ailleurs, l'OMS met en avant la nécessité de mieux évaluer les antibiotiques dans des modèles précliniques pertinents. C'est dans cette perspective que le projet PulmoCRAB' s'inscrit.

Une étude préliminaire a permis de discriminer 3 souches virulentes parmi 30 testées.

Ces 3 souches sélectionnées seront donc caractérisées dans un modèle murin d'infection pulmonaire à *Acinetobacter baumannii* multi-résistant.

Dans le cadre de cette étude, une attention particulière sera portée au respect de la règle des 3R. Le nombre d'animaux nécessaire pour répondre aux hypothèses et permettre une analyse statistique robuste a été réduit à 6 ou 8 par groupe (au lieu de 10). Malheureusement, aucune stratégie de remplacement ne peut être envisagée pour cette étude, du fait de l'impossibilité à reproduire *in vitro* la pathologie pulmonaire dans son ensemble. Enfin, un enrichissement du milieu (jouets en plastique, igloos en carton) sera utilisé et une surveillance accrue les 8 premières heures sera également réalisée pour cette étude (raffinement).

486 souris sont nécessaires pour la mise en œuvre de ce projet. Une analyse rétrospective sera réalisée à la fin du projet.

14591 L'hémophilie est une maladie génétique, grave et invalidante, caractérisée par un déficit total ou partiel en facteur VIII (FVIII) de la coagulation pour l'hémophilie A et en facteur IX (FIX) pour l'hémophilie B, facteurs dit « anti-hémophiliques », sans lesquels la coagulation est impossible.

La prophylaxie est considérée comme traitement optimal de l'hémophilie dans de nombreux pays. Les protocoles les plus efficaces préconisent une injection de grandes quantités de facteur anti-hémophiliques par voie intraveineuse 2 à 3 fois par semaine et nécessitent. Leur prix est encore élevé et trois stratégies sont actuellement développées pour améliorer les molécules coagulantes

- amélioration de sa production en système cellulaire,
- augmentation de son activité spécifique (afin de diminuer la dose injectée)
- allongement de sa demi-vie (afin de réduire le nombre d'injections).

Le but de ce projet est de tester de nouveaux facteurs de la coagulation (le FIX pour l'hémophilie B et le FVIII pour l'hémophilie A) déjà caractérisés au laboratoire conçus pour présenter une activité améliorée et une demi-vie allongée. Toutes les molécules coagulantes utilisées générées par les grands groupes industriels valident leurs nouvelles molécules ainsi chez des souris déficientes en FVIII pour l'hémophilie A et en FIX pour l'hémophile B.

Ces nouvelles molécules permettraient de traiter les patients non plus 2 à 3 fois par semaine mais une fois tous les 15 jours. C'est un enjeu majeur pour l'adhésion du patient au traitement, notamment pour les enfants.

Pour ce projet, 90 souris hémophiles A et autant de souris hémophiles B seront nécessaires pour la réalisation des études et pour obtenir des résultats scientifiquement et statistiquement fiables. Ce nombre pourrait être réduit en fonction des résultats observés. Aucune méthode alternative ne permet le remplacement des animaux proposés, car il s'agit d'une étude d'effets sur la coagulation sanguine.

Les principales procédures consisteront à injecter un faible volume de molécules anti-hémophiliques et à prélever chaque souris deux fois. Ces gestes provoqueront un inconfort de très courte durée mais ils seront exécutés sous contention légère et sous anesthésie gazeuse. Du fait de leur statut hémophile, des points de compressions avec une gaze pourront être réalisés sur les souris après les injections des produits et les prélèvements de sang dans le but de prévenir des risques hémorragiques suite à ces actes. Cependant, malgré leur phénotype dommageable, ces souris présentent très peu de signes cliniques tels qu'observés chez l'homme (nombreuses hémorragies internes) facilitant ainsi son utilisation et la réalisation de gestes invasifs comme l'injection ou le prélèvement de sang.

Durant le projet, tout sera mis en œuvre pour minimiser le stress de l'animal et améliorer son bien-être (conditions d'hébergement de l'animal, ...). Un suivi quotidien des animaux sera effectué et permettra d'évaluer si un animal atteint un des points limites auquel cas il sera profondément anesthésié puis euthanasié.

Le recours aux méthodes et techniques visant à supprimer ou à réduire au strict minimum les atteintes aux animaux seront donc systématiquement recherchées pour répondre au mieux aux critères de remplacement, de réduction et de raffinement (3R) :

- 1) Remplacement la souris est un modèle approuvé, fiable, des lignées hémophiles A et B sont disponibles
- 2) Réduction le nombre d'animaux utilisés dans ce projet sera réduit à son minimum sans compromettre la significativité statistique de l'expérimentation
- 3) Raffinement toutes les mesures seront prises pour veiller au bien-être de l'animal. Les conditions de l'élevage, de l'hébergement, des soins et des méthodes utilisées pour chaque étape de l'expérimentation se feront sous condition de minimiser douleurs, souffrance, angoisse et dommages durables que pourraient ressentir l'animal.

Les expérimentateurs sont formés aux gestes impliquant un contact avec l'animal et à l'observation des signes cliniques fondamentaux, notamment dans le domaine de la coagulation. Selon les données antérieures issues de nos projets précédents, nous estimons le nombre d'individus à 90 par modèle (modèle hémophile A 90 modèle hémophile B 90 soient, pour une durée totale de 5 ans, 180 souris.

14592 L'objectif de ce projet est de tester les effets d'une molécule, la ceftriaxone, afin de renverser certaines altérations neuronales observées dans un modèle murin de dystrophie myotonique de Steinert (DM1). La DM1 est une maladie qui touche 1 personne sur 8000 en France, et est caractérisée par une grande variabilité dans sa nature et la sévérité des symptômes (faiblesse musculaire, myotonie, cataracte précoce, troubles cardiorespiratoires, hypersomnolence, hyperinsulinisme et anomalies cognitives et comportementales...). La forme la plus grave de la DM1 est la forme néonatale, qui se manifeste dès la naissance, et aux symptômes précédemment décrits s'ajoute alors un retard mental illustrant l'atteinte du système nerveux central (SNC). Il n'existe à ce jour aucun traitement efficace de cette maladie. Nous étudions plus précisément les dommages du SNC, et un modèle de souris transgéniques porteuses du gène muté responsable de la DM1 a été mis au point (souris DMSXL). Ces souris reproduisent de nombreuses caractéristiques de la forme néonatale de la DM1. Nos précédentes études sur ce modèle ont montré une altération importante de la recapture du glutamate par les transporteurs spécifiques de ce neurotransmetteur essentiel pour la mémoire et l'apprentissage, dans l'hippocampe des souris DMSXL. Ceci était corrélé avec

des atteintes de la plasticité synaptique, reflet cellulaire des processus de mémorisation et du comportement mnésique. Au cours de ce projet, nous souhaitons étudier une propriété particulière de la ceftriaxone, qui est de promouvoir l'expression des transporteurs du glutamate, et décrite dans la littérature comme un mécanisme global de neuroprotection. Nous espérons ainsi restaurer la transmission et la plasticité synaptique chez les souris DMSXL traitées, qui serait corrélée avec la normalisation du niveau extracellulaire de glutamate. Cette étude est envisagée comme une preuve de concept qui vise à identifier les transporteurs du glutamate comme cibles majeures de la DM1 au niveau du SNC, et à explorer des voies possibles de traitement des conséquences cérébrales de la DM1.

Les dispositions prises pour l'application de la règle des 3R seront les suivantes. « Remplacer » Notre projet ne peut s'entreprendre qu'à l'aide d'un modèle animal dans la mesure où il est impossible de reproduire le décours temporel d'une maladie humaine, mais aussi l'intégrité et la complexité de l'environnement extracellulaire tel qu'il existe in situ dans le cerveau par des neurones en culture ou par modélisation informatique. « Réduire » : Nous avons calculé le nombre d'animaux à utiliser par groupe expérimental de manière à garantir une puissance statistique suffisante tout en réduisant au maximum ce nombre en regard des nombreuses variables à étudier. 108 souris au total seront nécessaires pour ce projet.

D'un point de vue du raffinement, les animaux seront hébergés à plusieurs dans des cages enrichies à l'aide de coton et d'abris en carton dans un environnement exempt d'organismes pathogènes. Afin de réduire la souffrance et le stress des animaux, un suivi du bien-être sera réalisé quotidiennement, et une grille d'évaluation de critères pertinents nous permettra de définir des points limites. Une attention particulière sera portée au poids et à la prise alimentaire, car les souris DMSXL, de phénotype dommageable, ont un poids 30% inférieur aux animaux contrôles du même âge. De l'alimentation molle (gels nutritifs ou croquettes hydratées) sera fournie directement dans la cage si nécessaire. Le traitement par la ceftriaxone nécessite une injection intra-péritonéale quotidienne durant 2 semaines. Ces injections seront pratiquées par le personnel qualifié de l'établissement utilisateur, après anesthésie locale systématique chez tous les animaux des groupes traités. Un examen minutieux de l'abdomen sera ainsi réalisé journalièrement, afin de détecter précocement tout signe délétère sur le bien-être des animaux lié à l'acte d'injection.

14593 L'animalerie est dédiée à former des jeunes au métier d'animalier de laboratoire. Les jeunes sont formés avec cet outil lors de séances de travaux pratiques et lors de semaines de stages réalisées dans les zones d'élevage.

Les travaux pratiques (TP) s'adressent à des élèves de la formation « baccalauréat professionnel Technicien en Expérimentation Animale » dans le cadre des enseignements de zootechnie et biologie appliquées à l'animal de laboratoire ainsi qu'aux stagiaires de formation continue et de formation réglementaire relatifs à l'utilisation d'animaux vivants à des fins scientifiques. Ces élèves et ces stagiaires sont destinés à exercer la profession de technicien et doivent être à même de trouver un emploi dans des instituts de recherche publique, tels que l'Inserm, le CNRS, l'INRA, les universités ou dans des laboratoires privés (laboratoires pharmaceutiques, etc.).

Ils seront amenés dans leur futur emploi, où sont appelés dans leur emploi existant à travailler sur animaux vivants. Les professionnels souhaitent que ces élèves ou ces stagiaires soient bien formés aux différentes techniques utilisées en expérimentation animale. La maîtrise des gestes techniques sur l'animal de laboratoire est un travail de longue haleine et porte sur plusieurs années.

Les espèces choisies pour la formation des techniciens en expérimentation animale sont les espèces les plus représentatives utilisées dans la recherche française et européenne c'est-à-dire la souris, le rat, le lapin et le chien. Les effectifs animaux élevés à l'animalerie sont optimisés pour répondre aux besoins des travaux pratiques et de reproduction pour certaines espèces (rongeurs et lapins), ce qui permet d'élargir le champ de compétences des élèves et stagiaires.

Ces effectifs sont

120 souris mâles et 120 souris femelles par an fournis et 100 souris produites, soit 1700 souris sur 5 ans.

120 rats mâles et 120 rats femelles par an fournis et 200 rats produits, soit 2200 rats sur 5 ans.

30 lapins mâles et 30 lapins femelles par an et 30 produits, soit 300 lapins sur 5 ans.

8 chiens mâles réutilisés tous les ans sur une période de 5 ans.

Soit 878 par an et 4208 animaux au total sur 5 ans.

Les procédures expérimentales réalisées sur les différentes espèces animales sont des injections et des prises de sang. Ces procédures seront limitées aux animaux utilisés pour les travaux pratiques. Depuis 5 ans, le nombre de rongeurs utilisés a diminué par une rationalisation de la reproduction. De même, les lapins sont ré-utilisés sur 2 ans et les chiens sur 5 ans, ce qui réduit le nombre total d'animaux sur 5 ans.

De plus, les enrichissements de milieu (jouets, tubes) mis en place chez toutes les espèces et l'hébergement libre des chiens dans une pièce d'hébergement, sur copeaux répondent aux exigences de raffinement. L'élaboration des procédures définissant les points limites chez toutes les espèces et l'élaboration des cahiers d'utilisation des animaux en TP nous permettent de mieux appréhender la souffrance et l'angoisse des animaux. Ces mesures nous garantissent le raffinement de notre expérimentation.

L'utilisation de supports vidéos pédagogiques et les cours sur les méthodes alternatives nous permettent d'appréhender le remplacement des animaux.

14594 L'exposition à des contaminants présentant un effet perturbateur endocrinien est une problématique sociétale émergente dans notre société. Une des cibles importantes des perturbateurs endocriniens est la production des hormones thyroïdiennes. Les hormones thyroïdiennes contrôlent le métabolisme énergétique chez l'adulte et elles sont aussi indispensables au contrôle du développement du système nerveux central chez l'embryon et le jeune enfant. L'exposition même légère à des perturbateurs thyroïdiens à ces stades de développement peut donc avoir des conséquences irréversibles et potentiellement difficiles à quantifier (baisse des capacités intellectuelles par exemple). Si le grand public et les autorités ont bien pris conscience de la problématique, la réglementation bute sur plusieurs points dont le manque de tests sensibles pour détecter expérimentalement un effet perturbateur thyroïdien et également de méthodes pour la métrologie d'exposition sur une population. Cette demande s'intègre dans un projet qui consiste à établir à partir de méthodes isotopiques et innovantes de métabolomique des tests de détection et des méthodes de métrologie. Les contaminants choisis pour cette étude sont des polluants environnementaux de différentes natures (plastifiants, désinfectants, pesticides...) qui ont été trouvés dans des fluides de cohortes notamment françaises de femmes enceintes. Nous ciblerons principalement de potentiels effets sur la captation d'iode. Les effets des molécules seront d'abord évalués sur des modèles *in vitro* appropriés en utilisant des tests sensibles basés sur la captation d'iode radioactif. Nous étudierons sur les animaux uniquement les molécules pour lesquels des effets perturbateurs ont été détectés sur nos modèles.

Les analyses sur le rongeur combineront des approches utilisant l'imagerie isotopique et des méthodes innovantes de métabolomique. L'imagerie isotopique permettra une appréciation directe d'un effet des contaminants sur la captation d'iode par la thyroïde. Nous pourrons ainsi mettre en corrélation ces effets perturbateurs avec l'obtention de signatures spécifiques du métabolome notamment urinaire. Ce travail devrait conduire à de nouvelles méthodes non invasives utilisables à plus grande échelle mais également susceptibles de permettre une métrologie de l'exposition sur une population humaine. Il est important de noter que le laboratoire demandeur possède une expertise spécifique (a priori unique), les modèles et les équipements pour les études proposées. Pour réaliser cette étude, nous planifions d'utiliser 2220 souris C57BL6 femelles de 8 semaines naïves, 288 gestantes et 1728 embryons (soit 4236 animaux). Nous testerons uniquement les contaminants sélectionnés par nos tests préalables *in vitro*. Des expositions contrôles induisant des effets bien caractérisés sur la captation d'iode seront aussi réalisées. Une partie des animaux exposés seront suivis par des techniques d'imagerie isotopique *in vivo* puis euthanasiés. Pour l'autre partie des souris, les urines seront recueillies ainsi que les thyroïdes après euthanasie.

Remplacement des études *in vitro* sont en cours, afin de limiter l'étude *in vivo* aux contaminants ayant l'effet étudié. Raffinement l'utilisation de la technique d'imagerie isotopique non invasive SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography) permet d'étudier *in vivo* des organes accumulant de l'iode. De plus, les animaux seront hébergés dans une zone spécifique agréée. Ils évolueront dans un environnement adapté à leur espèce. Des cages de surface réglementaire avec nourriture et eau ad libitum, maisons et morceaux de bois pour nidification seront utilisées. Réduction le nombre d'animaux a été choisi en suivant un modèle de calcul statistique permettant de définir le nombre de souris suffisant pour l'obtention de résultats significatifs. Les concentrations utilisées pour le traitement sont basées sur des données toxicologiques. Nous utiliserons au maximum les Doses Sans Effet Nocif Observable (DSENO).

L'urine sera collectée sans manipulation de la souris en la plaçant dans une cage adaptée pour la collecte. Durant les expériences d'imagerie, les animaux sont anesthésiés dans un environnement contrôlé (température, ventilation pulmonaire). Les animaux seront suivis tout au long du protocole. De la phase d'acclimatation, à la phase d'expérimentation puis à l'euthanasie, des fiches de suivi ont été établies. Des points limites ont été établis spécifiquement pour cette expérimentation qui permettront d'assurer au mieux le bien-être de l'animal afin d'éviter toute souffrance inutile. Toutes ces expérimentations seront réalisées par un personnel formé et qualifié pour les techniques utilisées.

14595 L'espérance de vie de l'humain s'est considérablement accrue au cours du siècle dernier et le taux de personnes âgées de plus de 65 ans avoisine aujourd'hui 15% et devrait atteindre 20% en 2030. Cependant, le vieillissement de la population a conduit à une augmentation considérable de l'incidence des maladies chroniques liées à l'âge, et est aujourd'hui reconnu comme un facteur de risque majeur pour les maladies cardiaques comme l'insuffisance cardiaque (IC). L'IC correspond à l'incapacité du cœur à assurer un débit sanguin suffisant au fonctionnement normal de l'organisme. Son incidence augmente de manière exponentielle avec l'âge car le diagnostic est difficile (fatigues, essoufflements,) et n'est pas toujours associé à un événement cardiovasculaire déclenchant, ce qui entraîne une prise en charge souvent tardive. De plus, les personnes âgées ne bénéficient pas toujours des meilleurs traitements par crainte des effets secondaires. Ainsi, la prévention de l'IC associée au vieillissement représente aujourd'hui un enjeu majeur pour améliorer la prise en charge des personnes âgées afin d'associer le maintien de la qualité de vie à l'augmentation de la longévité.

L'amélioration de la prise en charge ne pourra être réalisée qu'en disposant de modèles expérimentaux reproduisant l'état de fragilité observé chez l'Homme. C'est pourquoi il existe aujourd'hui différents modèles d'études chez l'animal qui ont permis d'améliorer de manière significative la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la physiopathologie de l'IC. Dans l'étude du vieillissement cardiaque, en raison d'un développement parfois idiopathique de l'IC, l'un des axes de recherche consiste à prévenir les désordres moléculaires avant leurs apparitions. Il a ainsi été démontré au cours des dernières années que l'utilisation de compléments alimentaires ou de régimes supplémentés pouvait avoir un rôle majeur sur la santé cardiaque.

Dans ce projet, nous étudierons l'effet de régimes adaptés/de compléments alimentaires sur les complications cardiaques de l'IC chez des rats âgés car la physiopathologie chez le rat est proche de celle observée chez l'humain. Nous évaluerons la progression de la pathologie par échographie cardiaque chez des animaux âgés de 16 mois que nous garderons jusqu'à 24 mois. L'échocardiographie est l'examen de référence pour l'étude du remodelage cardiaque car il possède de nombreux avantages. Il est non-invasif et permet de réaliser un suivi longitudinal précis et spécifique tout en réduisant à son minimum le nombre d'animaux utilisés. Tous les 2 mois seront ainsi étudiés les dimensions et la fonction cardiaque chez chacun des rats. C'est aujourd'hui l'examen prescrit en première intention chez les patients souffrants de complications cardiaques ou nécessitant un suivi préventif. Il apparaît donc tout à fait indiqué dans ce modèle de vieillissement cardiaque. L'efficacité des traitements pourra également être évaluée en fin de protocole par une mesure des pressions artérielles et ventriculaires qui sont des marqueurs de l'atteinte cardiaque.

Ces mesures seront suivies par des prélèvements tissulaires effectués dans le but d'évaluer précisément l'efficacité des régimes étudiés.

Lors de ce projet, les conditions d'hébergement des rats seront strictement contrôlées. La température et l'hygrométrie seront relevées quotidiennement et l'eau et la nourriture seront accessibles ad libitum afin de ne pas occasionner de stress supplémentaires chez les rats. Les animaux auront également accès à différents types d'enrichissements (cylindres en cartons pour l'exploration et bouts de bois à ronger) et seront changés de manière hebdomadaire. De plus, afin de s'assurer de l'appétence des régimes spéciaux utilisés, les rats seront observés quotidiennement et pesés de manière hebdomadaire durant la phase d'habituation. Un contrôle de la prise alimentaire sera également réalisé chaque mois. Les différents stades de la procédure nécessitent l'anesthésie des animaux qui sera adaptée à l'examen pratiqué

- anesthésie générale à l'isoflurane sans valence analgésique pour l'échocardiographie car c'est un examen non-invasif. Cela permet également un réveil plus rapide de l'animal.

- anesthésie générale à l'isoflurane associée à une analgésie à la buprénorphine (0,03 mg/kg) en prémédication lors des mesures de pression afin d'avoir une couverture analgésique efficace lors des tests. Seront également suivi lors de ces mesures un monitoring de la fréquence cardiaque et de la température des rats. Ce suivi des signes cliniques permet de prévenir l'apparition de la douleur/inconfort ou de la quantifier en cas de signes douloureux afin d'ajuster la profondeur de l'anesthésie si besoin. Cela permet de maximiser le raffinement des conditions de chirurgie et de bien-être pour l'animal.

En tant que prestataire de services pour différents laboratoires pharmaceutiques développant des régimes supplémentés ou des compléments alimentaires, nous sommes responsables de la partie in-vivo, à savoir l'hébergement et le suivi des animaux par échographie. Ce projet est estimé sur 5 ans et le nombre total d'animaux a été déterminé par un calcul de $n=88$ animaux par série expérimentale pour un total de 4 séries sur 5 ans, soit 352 animaux. Chaque série expérimentale se compose de 4 groupes et chaque groupe se compose de 20 à 24 animaux. En raison du contexte de l'étude qui nécessite de réaliser un suivi de plusieurs mois sur des animaux vieux, il apparaît nécessaire de considérer la mortalité due à l'âge dans ce modèle, qui est de l'ordre de 20% chez le rat de 24 mois. L'utilisation de l'échographie pour réaliser le suivi longitudinal des paramètres cardiaques permet de limiter à son minimum le nombre de rats utilisés et permet de respecter le principe de réduction.

14596 Le cancer constitue la seconde cause de mortalité dans le monde avec près de 8.8 millions de décès en 2015 selon l'Organisation Mondiale de la Santé. Les traitements courants comprenant chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie sont lourds pour les patients et leurs résultats ne sont pas garantis. La raison principale étant qu'il est aujourd'hui encore très difficile de cibler uniquement mais intégralement les cellules cancéreuses.

Les bactéries utilisées dans cette étude ont pour objectif de cibler les tumeurs et de délivrer en leur sein, des molécules anti-cancéreuses. Pour cela, ces bactéries ont été modifiées afin de réduire leur virulence, ainsi elles seront inoffensives dans un environnement sain (système immunitaire normal) mais proliféreront dans un environnement tumoral (système immunitaire perturbé). Ce qui en fait d'excellents transporteurs de molécules anti-cancéreuses.

Le but de cette étude est d'évaluer la toxicité chronique de ces bactéries à activité anti-cancéreuse chez le lapin mâle sain après administration par voie intra-veineuse (IV) ou intra-musculaire (IM). De plus nous souhaitons confirmer les résultats des études de toxicité aigüe obtenus initialement chez les mâles, chez les femelles.

Des études ont déjà été réalisées chez la souris porteuse de tumeur. Les résultats prometteurs poussent à tester ce traitement sur un modèle non-rongeur afin d'évaluer les risques d'une telle thérapie avant de passer au test clinique chez l'homme. Une précédente étude a déjà permis d'étudier la toxicité aigüe de ces bactéries chez le lapin mâle. 12 lapins seront nécessaires à la réalisation de cette étude qui durera 1 mois pour les mâles et 1 semaine pour les femelles.

La mise en place de ce projet s'est attachée à respecter la règle des 3R

Remplacer Une partie des résultats préliminaires a été réalisée *in vitro* mais la complexité d'un être vivant ne peut pas être mimée en laboratoire nécessitant l'utilisation de modèles animaux.

Réduire Cette étude a été construite en utilisant le nombre minimum d'animaux (seulement 2 par groupe) permettant une comparaison de l'effet d'inoculations répétées en IV ou IM chez les lapins mâles et de l'inoculation unique chez les femelles.

Raffiner La totalité des procédures impliquant un inconfort potentiel des animaux (injections IV et mises à mort) sera réalisée sous anesthésie locale ou générale. Les animaux seront hébergés dans un environnement adapté et enrichi.

14597 Le cancer constitue la seconde cause de mortalité dans le monde avec près de 8.8 millions de décès en 2015 selon l'Organisation Mondiale de la Santé. Les traitements courants comprenant chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie sont lourds pour les patients et leurs résultats ne sont pas garantis. La raison principale étant qu'il est aujourd'hui encore très difficile de cibler uniquement mais intégralement les cellules cancéreuses.

Les bactéries utilisées dans cette étude ont pour objectif de cibler les tumeurs et de délivrer en leur sein, des molécules anti-cancéreuses. Pour cela, ces bactéries ont été modifiées afin de réduire leur virulence, ainsi elles seront inoffensives dans un environnement sain (système immunitaire normal) mais proliféreront dans un environnement tumoral (système immunitaire perturbé). Ce qui en fait d'excellents transporteurs de molécules anti-cancéreuses.

Le but de cette étude est d'évaluer la toxicité aiguë d'une dose élevée de ces bactéries chez le lapin sain après administration par voie intra-veineuse.

Des études ont déjà été réalisées chez la souris porteuse de tumeur. Les résultats prometteurs poussent à tester ce traitement sur un modèle non-rongeur afin d'évaluer les risques d'une telle thérapie avant de passer au test clinique chez l'homme. Une étude pilote en échelle de dose n'a pas pu définir la dose maximale tolérée chez le lapin. 20 lapins seront nécessaires à la réalisation de cette étude.

La mise en place de ce projet s'est attachée à respecter la règle des 3R

Remplacer Une partie des résultats préliminaires a été réalisée *in vitro* mais la complexité d'un être vivant ne peut pas être mimée en laboratoire nécessitant l'utilisation de modèles animaux.

Réduire Les études précédentes ont permis de sélectionner une seule dose de bactérie limitant ainsi le nombre d'animaux impliqué dans l'expérience. La différence de toxicité attendue entre les élevages étant tout de même faible, 5 animaux par groupe seront nécessaires.

Raffiner la totalité des procédures impliquant un inconfort potentiel des animaux (injections intra-veineuses et mises à mort) sera réalisée sous anesthésie locale ou générale. Les animaux seront hébergés dans un environnement adapté et enrichi.

14598 Nous souhaitons étudier le rôle d'un récepteur spécifique dans la fonction cardiaque, et plus particulièrement dans le cadre d'une altération telle qu'une hypertension.

Ce projet vise ainsi à comprendre si la suppression de ce récepteur uniquement au niveau cardiaque pourrait modifier, de manière bénéfique ou non, les réponses du système cardiaque lors d'une hypertension.

Cette dernière sera modélisée par deux protocoles pharmacologiques différents qui impactent le système cardiaque à différents niveaux (vasculaire ou cardiaque).

Ces travaux sont une étape nécessaire dans le développement de traitements potentiels des troubles cardiaques observés chez les patients souffrant d'insuffisance cardiaque ou d'hypertension.

Le modèle Souris nous permet d'accéder à des animaux génétiquement modifiés, de manière spécifique dans un tissu, permettant d'inactiver l'expression d'un récepteur chez des animaux adultes.

Il s'agit d'une approche très utile pour déterminer la fonction d'un récepteur ou d'une protéine dans un organisme vivant.

Dans ce projet, nous prévoyons donc d'analyser des animaux génétiquement modifiés, porteurs d'une mutation conditionnelle (cardiaque, activable à l'aide d'une molécule spécifique) du gène codant pour le récepteur que nous étudions.

La fonction cardiaque de ces animaux sera étudiée après inactivation du récepteur et sera comparée à d'autres animaux recevant l'un des traitements pharmacologiques visant à entraîner une hypertension.

Des animaux contrôles non porteur de la mutation seront aussi analysés afin de déterminer les variations liées au récepteur et celles liées aux traitements pharmacologiques.

Chaque groupe expérimental sera constitué de 9 animaux, cet effectif étant suffisant pour obtenir des résultats statistiquement interprétables dans les protocoles d'analyse prévus (suivi de la pression artérielle, échographie cardiaque et électrocardiogramme).

Nous souhaitons donc employer un total de 54 souris pour ce protocole, comparant des animaux exprimant ou non le récepteur d'intérêt, dans des conditions physiologiques ou avec l'un ou l'autres des deux protocoles d'hypertension (6 conditions au total).

REMPLACEMENT nous ne disposons pas d'une autre possibilité d'étudier la fonction d'un récepteur dans un organisme visant uniquement à l'âge adulte et dans le cadre d'atteintes de la fonction cardiaque, le modèle Souris constitue la meilleure approche disponible à ce jour pour cela.

RAFFINEMENT l'ensemble des procédures expérimentales implique un soin et une surveillance constants des animaux, afin de s'assurer que les protocoles pharmacologiques n'entraînent pas de souffrance chez les souris. Des points limites spécifiques à chaque procédure expérimentale sont décrits, et suivis avec la structure du bien-être animal de notre institut. Ainsi, le suivi post-implantatoire des pompes osmotiques délivrant les traitements pharmacologiques déclenchant l'hypertension comprendra une surveillance de l'incision, du poids de l'animal, de son état général. Un tapis chauffant permettra aux animaux de maintenir leur température corporelle durant l'anesthésie. Du gel ophtalmique sera appliqué pour éviter le dessèchement de la cornée. Par ailleurs, la douleur sera prise en charge au moment de l'incision puis dans les jours qui suivent.

REDUCTION des analyses de puissance ont permis de définir les effectifs utilisés dans ce projet, afin d'obtenir des conclusions scientifiquement exploitables pour les procédures expérimentales retenues.

14599 Il s'agit d'évaluer sur des modèles de rongeurs la biocompatibilité (réaction inflammatoire, vascularisation, persistance ou dégradation du matériau, persistance ou disparition des cellules, intégration au tissu hôte) et éventuellement la fonction des matériaux, ou des produits d'origine humaine, destinés à la régénération de lésions tissulaires graves. Du fait du risque de réaction de rejet par l'hôte des éléments greffés, nous utiliserons des rats immuno-déficients (système immunitaire affaibli) pour ces études. La majorité des expériences seront conduites dans une animalerie autorisant la manipulation de produits d'origine humaine. L'implantation en site sous-cutané est le test de biocompatibilité *in vivo* de première intention, car il est simple à mettre en oeuvre, recourt à une chirurgie très légère, engendre une douleur opératoire ou post-opératoire très faible, de très rares complications post-opératoires (infection au site de l'incision) qui peuvent être facilement traitées si elles surviennent (nettoyage par antiseptique local). Enfin, en fonction des matériaux étudiés, il est possible de réaliser au moins 4 implantations par animal, ce qui permet de réduire le nombre d'animaux. Les études effectuées nécessiteront le sacrifice des animaux pour procéder à des analyses histologiques. Le choix des dates de sacrifice sera limité à des temps classiquement décrits dans la littérature comme permettant la mise en évidence de l'inflammation aiguë (7 jours), de la formation de corps étrangers (14 jours) et de la fibrose (21 jours). Des temps plus longs, pouvant aller jusqu'à 6 mois, seront utilisés pour mettre en évidence un processus biologique ou une fonction générée ou apportée par le biomatériau ou le dispositif implanté. Le nombre d'animaux utilisés pour chaque matériau et chaque temps expérimental sera de 8.

Remplacement, réduction, raffinement : Le remplacement n'est pas possible puisque la biocompatibilité implique des réactions multiples et complexes de l'organisme, qui ne peuvent être reproduites *in vitro*. Ne seront testés *in vivo* que les matériaux ayant démontré *in vitro* une absence de toxicité envers les cellules. Raffinement : l'insertion sous-cutanée des matériaux à l'aide d'une aiguille sera réalisée sous anesthésie gazeuse et après injection d'un analgésique il sera possible d'implanter jusqu'à quatre matériaux par animal, et d'analyser plusieurs paramètres à partir des mêmes prélèvements sur animaux après sacrifice, permettant de collecter un maximum d'informations sur les animaux utilisés, et donc de limiter le nombre d'animaux. Les animaux seront placés sur tapis chauffant lors de la procédure de chirurgie. L'hébergement, en adéquation avec le statut immunodéficient, bénéficiera d'un enrichissement de façon à améliorer le bien-être des animaux.

Le nombre total d'animaux pour ce projet est de 600 rats.

14600 Les allergies alimentaires constituent un problème majeur de santé publique du fait de leur prévalence et de la gravité des symptômes qu'elles engendrent. Plus généralement, les allergies figurent au quatrième rang des maladies selon l'OMS. Il n'existe aujourd'hui aucun traitement validé contre les allergies alimentaires. Or, une immunothérapie doit être commencée au plus tôt afin d'enrayer le développement de la marche allergique. De plus, certaines allergies sont développées en concomitance et un traitement à plusieurs allergènes d'un même groupe de famille pourrait être plus efficace.

Aucun test *in vitro* ne permet d'évaluer complètement la réaction allergique à un allergène. Ce projet vise donc à développer des modèles murins d'allergie (sensibilisation allergique) puis d'évaluer de nouveaux traitements contre cette maladie.

Les expériences ont été conçues en accord avec le principe de la règle des 3R (réduction, raffinement et remplacement).

Remplacement

Dans notre cas, nous nous focaliserons sur le modèle murin. Concernant l'induction de l'allergie, l'espèce souris est un modèle très utilisé en pathologie immunologique telle que l'allergie en raison des nombreux outils mis à disposition pour l'analyse des réponses immunes. Cette espèce est également proche de l'homme en ce qui concerne certains marqueurs de la réponse immunologique. De plus, Il n'existe à ce jour aucun autre modèle alternatif (méthode *in vitro*) mimant aussi bien les signes cliniques de l'allergie alimentaire présents chez l'Homme.

Raffinement : Une surveillance quotidienne sera réalisée sur tous les animaux en cours de protocole et toutes les observations seront enregistrées dans des tableaux d'observation manuscrits insérés au rapports d'étude. De plus, des points limites précis, prédictifs et précoces ont été mis en place afin de limiter la douleur et le stress des animaux à leur minimum. Dans le cas de procédures pouvant éventuellement générer du stress ou de la douleur, les animaux seront anesthésiés et/ou analgésiés. La température corporelle des animaux sous anesthésie sera maintenue à l'aide de tapis chauffants. Le bien-être des animaux est également planifié, les animaux seront hébergés par groupes d'individus compatibles, dans des conditions contrôlées permettant ainsi leur bien-être telle que la mise en place d'une diversification du milieu (ajout de papier cartonné permettant la nidification, maisonnette, musique).

Une surveillance quotidienne est réalisée sur tous les animaux en cours de protocole. Toutes les observations (graduées par des points limites spécifiques liés à l'expérience) sont enregistrées dans des tableaux d'observation manuscrits, insérés au rapport d'étude.

Réduction : Le nombre d'animaux prévu à l'étude s'élève à 2400 souris âgées au minimum de 4 semaines. Cette évaluation du nombre d'animaux par groupe sera suffisante pour générer des mesures nous permettant de réaliser des analyses statistiques cohérentes et robustes nous permettant ainsi de mettre en évidence l'efficacité ou non de la sensibilisation et du traitement. Cette évaluation du nombre de souris prend aussi en compte la possibilité de dupliquer et confirmer les

résultats obtenus. Les points limites pris en considération pour cette étude sont le bien-être et l'état physique de l'animal avec utilisation d'un système de scores.

La réduction du nombre d'animaux reposera sur la mise en place d'une stratégie expérimentale réfléchie et validée lors de comités scientifiques. Elle permettra d'inclure pour chaque procédure le juste nombre d'animaux. D'autre part, chaque procédure sera conçue de manière à valider, ou non, l'intérêt de débiter la procédure suivante.

14601 Les allergies alimentaires constituent un problème majeur de santé publique du fait de leur prévalence et de la gravité des symptômes qu'elles engendrent. Les maladies allergiques respiratoires se sont considérablement répandues au sein de la population ces dernières décennies, au point d'atteindre des niveaux record dans les pays occidentaux où l'on estime qu'environ une personne sur quatre présente des symptômes cliniques d'allergie. Plus généralement, les allergies figurent au quatrième rang des maladies selon l'OMS. Il n'existe aujourd'hui aucun traitement validé contre les allergies alimentaires. Concernant, les allergies respiratoires des traitements par voie sublinguale existent mais ne permettent pas d'être employés chez des jeunes enfants. Or, une immunothérapie doit être commencée au plus tôt afin d'enrayer le développement de la marche allergique.

Aucun test *in vitro* ne permet d'évaluer complètement la réaction allergique à un allergène. Ce projet vise donc à développer des modèles murins d'allergie puis d'évaluer de nouveaux traitements contre cette maladie.

Les expériences ont été conçues en accord avec le principe de la règle des 3R (réduction, raffinement et remplacement). En effet, nous projetons de réduire le nombre de souris utilisé tout en préservant la robustesse des analyses statistiques, nous envisageons donc d'utiliser 1390 souris femelles maximum, âgées de 4 semaines. Le protocole est planifié de telle sorte que toutes les analyses sont réalisées sur le même animal sans créer de souffrance ou de douleur supplémentaire. Le bien-être des animaux (raffinement) est également planifié, les animaux seront hébergés par groupes d'individus compatibles, dans des conditions contrôlées permettant ainsi leur bien-être et avec un enrichissement du milieu d'hébergement.

14602 L'évolution de nos sociétés et de nos modes de vie, l'augmentation de l'incidence de l'obésité, des maladies cardiovasculaires, du diabète, ainsi que le vieillissement de la population entraînent une forte augmentation de l'incidence (nombre de nouveaux cas par an) de patients atteints de maladie rénale. On parle d'une vraie épidémie de maladie chronique. Indépendamment de la cause de la maladie rénale, le mécanisme dominant menant vers l'insuffisance rénale chronique (IRC) et sa progression vers le stade terminal est la fibrose. Les unités fonctionnelles, les néphrons sont remplacés par un tissu fibreux non fonctionnel. Quelle qu'en soit donc l'origine, la maladie rénale aboutit donc au développement d'une fibrose dont la présence signe l'évolution vers la perte de la fonction rénale. Maîtriser la fibrose c'est ralentir toutes les maladies rénales dans leur évolution vers l'état terminal. Or, la fibrose n'est pour le moment pas maîtrisable.

L'objectif de cette étude est la mise en évidence chez l'animal insuffisant rénal chronique d'une thérapie innovante pour le traitement de la fibrose rénale. Une nouvelle classe de molécule, les phostinesTM, a été développée pour cibler les mécanismes de glycosylation aberrants liés à divers états pathologiques. Une des phostinesTM, le PST3.1a, est disponible et agit sur les cellules en état de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT). Or, cette EMT est l'un des mécanismes présentés comme favorisant le développement de la fibrose rénale.

L'étude sera réalisée sur un modèle de rat OFA rendu insuffisant rénal chronique par une réduction de la masse rénale (RMR) obtenue chirurgicalement par ablation d'un rein et infarctus des 2/3 du rein restant. Le rat RMR est le modèle de référence d'insuffisance rénale chronique qui développe une fibrose rénale. Le traitement PST3.1a sera administré aux animaux en traitement préventif ou curatif dans l'eau de boisson.

Cette étude sera réalisée sur 8 rats pour chacun des 7 groupes RMR Témoins et PST aux trois temps de 4, 8 et 12 semaines plus un groupe réversibilité recevant le PST de la 4^{ème} à la 12^{ème}

semaine. Avec 4 rats supplémentaires pour pallier les éventuelles pertes (5-10%), c'est un total général de 60 rats qui seront utilisés dans ce projet. Pour réduire le nombre d'animaux, aucun animal intact (non opéré) avec ou sans traitement PST3.1a n'a été inclus. Le raffinement de nos méthodes consiste en une observation quotidienne sans interruption des rats. Le poids des animaux sera suivi toutes les semaines et les signes de souffrance seront recherchés. La cage comprendra une litière avec copeaux dans un environnement enrichi. L'étude portant sur le développement d'une maladie chronique et sur l'interaction entre différents organes, le modèle animal ne peut être remplacé

14603 La dépression majeure est un trouble de l'humeur qui affecte entre 8% et 15% de la population. D'après l'Organisation Mondiale de la Santé, cette pathologie sera la pathologie la plus coûteuse en 2030 devant les maladies cardiovasculaires, les maladies infectieuses et les cancers. La dépression est étroitement associée aux maladies cardiovasculaires et constitue un problème majeur de santé publique nécessitant la compréhension des mécanismes physiologiques et étiopathologiques sous-jacents. Or, bien que largement décrits en clinique, les mécanismes physiopathologiques sous-jacents aux liens entre maladies cardiovasculaires et états dépressifs restent largement incompris. C'est pourquoi une approche expérimentale sur des modèles animaux fiables de ces pathologies est nécessaire. Ainsi, l'utilisation de modèles animaux dans lesquels un état anormal est induit et maintenu pendant une période prolongée pourra fournir un outil pour répondre à ces questions. C'est la raison pour laquelle ce projet se base sur l'utilisation du modèle du stress chronique imprédictible (SCI) permettant de modéliser un état dépressif chez la souris mâle. Le présent projet consiste à caractériser les modifications cardiovasculaires concomitantes à l'apparition des symptômes dépressifs et de leurs traitements.

L'objectif sera donc de mesurer et évaluer l'impact du modèle de stress chronique imprédictible dans la cinétique du rythme cardiaque des souris. Ce projet pourrait permettre de découvrir partiellement les altérations cardiovasculaires lors d'un épisode dépressif.

Nous testerons 15 souris.

Raffinement L'enrichissement dans les cages d'hébergement pour les animaux durant la phase non stressés est systématique (cabanos, smarthomes® et tubes). Les animaux recevront un traitement analgésique avant, juste après et 24-48 suivant l'intervention, puis si nécessaire un traitement antibiotique. Chaque animal est placé sur une couverture chauffante pour éviter toute hypothermie. Les cornées sont protégées de la déshydratation. L'anesthésie gazeuse est ici privilégiée pour mieux contrôler la profondeur d'anesthésie et pour une meilleure récupération post-opératoire. Une surveillance post-opératoire d'une semaine est réalisée pour suivre chaque souris et intervenir si nécessaire.

Remplacement Comme ce modèle s'intéresse au comportement animal et aux changements physiologiques périphériques induits par le stress chronique, il ne peut s'entreprendre que sur l'animal vivant.

Réduction les effectifs sont optimisés Des études préliminaires indiquent que des effectifs de n=15 sont nécessaires pour dégager des effets significatifs compte tenu de la variabilité inter-individuelle des animaux dans les tests comportementaux.

14604 La dourine est une maladie parasitaire contagieuse (transmission par voie sexuelle) qui atteint les équidés avec un taux de mortalité très élevé (en moyenne de 50 %). Elle est causée par le parasite *Trypanosoma equiperdum*. Les signes cliniques de dourine évoluent par exacerbation et rechutes périodiques, et peuvent conduire à la mort de l'animal. A ce jour, il n'existe pas de traitement officiel ni de vaccin pour la dourine et il est préconisé par l'OIE (Organisation Mondiale de la Santé Animale) d'euthanasier les animaux atteints.

T. equiperdum, l'agent infectieux de la dourine est très proche au niveau génétique et phénotypique du parasite *Trypanosoma evansi* qui est l'agent infectieux du surra, maladie transmise par des insectes piqueurs pouvant atteindre de nombreuses espèces animales. La question de la

différenciation de ces parasites est extrêmement importante du point de vue sanitaire, puisqu'il existe un traitement officiel pour le surra, contrairement à la dourine.

Au niveau du diagnostic de la dourine, les trypanosomes n'étant présents dans le sang qu'à certains moments et en petit nombre, leur identification directe s'avère incertaine. Toutefois, les anticorps dirigés contre *T. equiperdum* sont présents dans le sang des animaux infectés, qu'ils manifestent ou non des signes cliniques. Ainsi, le diagnostic de la dourine repose sur la recherche sérologique d'anticorps dirigés contre *T. equiperdum* par le test de fixation du complément (TFC). Ce test est prescrit par l'OIE, comme unique test pour la détection de *T. equiperdum* dans le cadre d'échanges internationaux. Le manuel terrestre de l'OIE décrit les modalités de réalisation de ce test ainsi que les méthodes de préparation des réactifs biologiques nécessaires à sa mise en place et plus spécialement, la méthode de préparation des antigènes à partir de parasites *T. equiperdum* sur rats. Ainsi, il est nécessaire de disposer d'antigènes de *T. equiperdum* produits à partir de rats pour réaliser le diagnostic de la dourine en suivant les recommandations officielles internationales.

Ainsi, cette demande d'autorisation à expérimenter sur animaux vivants porte sur la production de parasites Trypanosomes sur rats selon cette procédure afin de

- produire les antigènes de *T. equiperdum* nécessaires à la réalisation du test officiel de diagnostic de la dourine en vue de leur mise à disposition auprès des laboratoires d'analyse français, européens et mondiaux

- produire des parasites du genre *Trypanosoma* dans le cadre de projets de recherches ayant pour vocation à améliorer les outils de diagnostics de la dourine et à améliorer les connaissances sur la différenciation de *T. equiperdum* et *T. evansi*.

Nous effectuons cette demande pour une durée de 5 ans et pour un maximum de 7 procédures par an. A raison de 21 rats par procédure cela correspond à un maximum de 735 rats sur l'ensemble de la demande. Le nombre de procédures réalisées par an sera déterminé en fonction des besoins en antigènes formulés par les laboratoires d'analyse ainsi que par les besoins de production de Trypanosomes dans le cadre des activités de recherche et d'amélioration du diagnostic menées par notre laboratoire. Si la production de parasites n'est pas nécessaire pour réaliser ces activités, le nombre de procédures ainsi que le nombre de rats utilisés seront réduit d'autant. Dans un souci de raffinement, l'euthanasie des rats a lieu quand le nombre de parasites comptés dans le sang de l'animal a atteint son niveau maximum et avant que les animaux ne développent de signes cliniques. Tout animal présentant le moindre signe d'affaiblissement devra être aussitôt euthanasié.

Le développement d'une méthode de production de parasites *in vitro* est actuellement en cours au sein d'un laboratoire de l'UE mais ces travaux ne sont, à ce jour, pas assez avancés pour permettre leur utilisation dans le cadre légal du diagnostic de la dourine, le recours à l'expérimentation animale reste donc nécessaire.

14605 Le diabète de type 2 (DT2), caractérisé par une résistance de l'organisme à l'insuline, est associé au développement de divers troubles du système nerveux central dont des troubles de la mémoire et du comportement émotionnel (anxiété, dépression). L'objectif général du projet est d'évaluer de manière intégrée l'effet neurobiologique de l'activation de la voie de signalisation du récepteur à l'insuline sur le comportement émotionnel et les modifications cellulaires et moléculaires sous-jacents. Ainsi, nous nous proposons dans un premier temps d'étudier en condition physiologique l'effet de l'insuline administrée par voie intranasale sur le comportement émotionnel des souris. Etant donnée l'implication du système sérotoninergique dans la régulation de l'humeur, nous étudierons dans un second temps l'effet de l'insuline intranasale sur ce système. Ces premiers résultats permettront de déterminer si l'administration intranasale d'insuline a un effet anxiolytique mais aussi l'identification des mécanismes moléculaires impliqués dans cet effet. Par ailleurs, notre thématique de recherche porte largement sur la résistance centrale à l'insuline dans le développement des troubles anxio-dépressifs, comorbidité psychiatrique dont les patients atteints de diabète de type 2 sont deux fois plus susceptibles de développer. De cette manière, évaluer l'effet de l'administration intranasale d'insuline dans un modèle de troubles anxio-dépressifs comorbide

au DT2 représente une perspective thérapeutique originale qui est d'ores et déjà explorées dans d'autres pathologies neurologiques (maladie d'Alzheimer, maladie de Parkinson)

L'étude des comportements anxio-dépressifs ne peuvent être réalisées que sur animaux vivants ce qui rend impossible le remplacement de ceux-ci par des modèles *in vitro*. Ce projet de 2 ans sera réalisé sur 768 souris en attachant une attention particulière à réduire le nombre d'animaux utilisés, notamment grâce à l'utilisation de tests statistiques robustes et adaptés. De plus, toutes les précautions possibles seront prises afin de raffiner nos procédures et réduire au mieux l'inconfort des animaux. Ainsi, les animaux seront hébergés en cage collective, dans un milieu enrichi et seront traités avec des analgésiques lors de procédures pouvant entraîner une douleur. Des tests statistiques robustes nous permettront d'utiliser le strict minimum d'animaux lors de nos expériences. Enfin, dans le but de réduire le nombre d'animaux utilisés, nous veillerons à ne faire aucun double emploi lors des différentes procédures.

14606 La maladie de Chagas, ou trypanosomiase américaine, est une maladie chronique causée par le parasite *Trypanosoma cruzi*. Elle est majoritairement transmise par les réduves, des insectes hématophages, mais peut aussi être transmise par voie congénitale, par transfusion de sang, par transplantation d'organe, ou par ingestion d'aliments contaminés. Elle sévit essentiellement en Amérique latine, où on recense plus de 10 millions d'individus infectés, mais des cas se sont déclarés récemment dans d'autres pays, plusieurs pays européens, les Etats-Unis, le Canada, le Japon et l'Australie. Parmi les individus infectés, 30 à 40% développent des problèmes cardiaques ou digestifs pouvant être fatals, causant environ 10600 morts par an. Ils existent des traitements antiparasitaires, mais ceux-ci présentent de nombreux effets secondaires et ne sont efficaces que s'ils sont administrés au début de l'infection. Or, la première phase de la maladie étant souvent asymptomatique, la majorité des patients sont diagnostiqués trop tard pour bénéficier de ces traitements. Un vaccin constituerait une approche particulièrement efficace pour prévenir les infections à *T. cruzi* et possiblement offrir une alternative thérapeutique aux traitements existants, efficace même à des temps plus tardifs de la maladie et/ou présentant moins d'effets secondaires.

L'objectif du projet est d'évaluer chez le primate non-humain un candidat vaccin à visée préventive et thérapeutique développé au sein d'un consortium international financé par l'Union Européenne, et ayant déjà montré son efficacité chez la souris. Il est aujourd'hui impossible de reproduire la complexité d'une réponse immunitaire au niveau de l'organisme entier par un modèle *in vitro*, et le recours à un modèle animal est nécessaire. Le macaque, de par sa proximité génétique à l'homme, permet l'étude de la réponse vaccinale à *T. cruzi* dans un contexte physiologique proche de l'être humain.

Dans une première étape, nous caractériserons l'infection expérimentale du macaque cynomolgus par une souche sauvage de *T. cruzi* afin de déterminer les voies d'administration et la dose qui permettent de reproduire au plus près l'infection et la maladie chez l'homme. Ces éléments constituent un préalable nécessaire pour évaluer l'efficacité de notre candidat vaccin. Dans un deuxième temps, les animaux seront immunisés, et nous évaluerons l'innocuité ainsi que la réponse immunitaire induite par le vaccin. Ils seront ensuite exposés au parasite afin de tester l'efficacité protectrice du vaccin et de caractériser les mécanismes du système immunitaire impliqués dans la protection.

Dans une troisième étape, nous évaluerons la capacité du vaccin, seul ou associé à un antiparasitaire déjà sur le marché, à combattre une infection parasitaire déjà établie. Pour cela, des animaux infectés seront immunisés au début de la phase chronique de la maladie. Nous étudierons l'impact de ce traitement sur la persistance du parasite dans l'organisme et caractériserons de manière approfondie la réponse immunitaire.

Au maximum, 115 animaux nés et élevés à des fins scientifiques dans des élevages agréés seront inclus dans ce projet de 5 ans. Le nombre d'animaux qui seront utilisés au cours des étapes deux et trois, sera déterminé en fonction de la variabilité des paramètres observés au cours de la première étape, et chacun des groupes expérimentaux sera ramené au minimum compatible avec l'utilisation de tests statistiques pour analyser les données. Les méthodes expérimentales (prélèvements sanguins et tissulaires) ont été définies de manière à éviter toute souffrance lors des

interventions (limitation des volumes sanguins prélevés; imagerie *in vivo* afin de limiter le plus possible le recours à des biopsies tissulaires, expositions au pathogène et injections des vaccins réalisés sous anesthésie générale). Les critères d'arrêt sont prévus dans le projet en cas de progression de la maladie ou d'éventuels effets inattendus du vaccin. Les vétérinaires de l'installation seront alertés et mettront en œuvre des traitements appropriés. Les animaux seront hébergés en groupe lors des phases d'immunisation et d'infection chronique et en individuel dans des modules contigus permettant des interactions sociales lors de la phase d'infection aiguë. Ils bénéficieront d'un programme défini par la cellule « bien-être animal » de l'établissement pour l'enrichissement de leur milieu de vie.

14607 Au sein de notre unité, nous travaillons principalement sur les cancers cutanés induits par le soleil et plus particulièrement les rayons ultraviolets de types B (UVB). Les cancers cutanés, appelés aussi carcinomes, sont très fréquents chez les personnes qui sont fortement et régulièrement exposées aux rayons du soleil au cours de leurs vies. Ils représentent 90 % des cancers cutanés diagnostiqués en France. Il est, par conséquent, primordial d'axer la recherche sur la compréhension des mécanismes qui sont à l'origine de cette carcinogénèse UVB induite afin de mieux les appréhender et les traiter.

Lors de précédents travaux, nous avons mis en évidence d'importants changements au niveau du métabolisme énergétique de la cellule au cours du processus de carcinogénèse. Trois voies majeures ont été identifiées comme étant à l'origine de ces tumeurs cutanées : la réparation de l'ADN, le stress oxydatif et le métabolisme énergétique mitochondrial. Cependant, ces mécanismes sont complexes et étroitement liés car la modification de l'un a un impact sur l'autre.

Par conséquent, au cours de ce projet, notre objectif sera de comprendre quelles interactions existent entre ces différentes voies et comment elles se régulent les unes par rapport aux autres afin de pouvoir les utiliser comme cibles thérapeutiques pour développer des traitements préventifs et/ou curatifs innovants contre les cancers cutanés UVB induits.

Pour étudier les interactions entre ces voies métaboliques et déterminer précisément la relation qui les lie, nous allons implanter des cellules tumorales humaines à des souris immunodéficientes afin d'éviter tout rejet de greffe. Les cellules injectées auront préalablement été transduites avec différents vecteurs lentiviraux de manière à inhiber l'expression de nos gènes cibles (XPC, HIF, TFAM et NOX). Une fois les cellules implantées nous pourrions suivre la croissance tumorale en fonction des gènes inactivés. Cette étude nous permet de connaître l'impact de ces trois voies dans la progression tumorale.

Ainsi pour la totalité du projet, nous prévoyons d'utiliser un total de 450 souris échelonnées sur 5 ans.

Pour répondre à la règle des 3Rs

- A ce jour, il n'existe pas de méthodes alternatives suffisamment prédictives pour mimer les cancers cutanés semblables à ceux de l'homme. Les modèles cellulaires ou 3D actuels nous permettent seulement de travailler sur des dysfonctionnements isolés de la maladie et non sur la maladie dans son ensemble au sein d'un individu tout entier. Nous ne pouvons donc pas remplacer le modèle utilisé par une méthode alternative. De plus, de part ces 99% d'homologies avec le génome humain, la souris représente le meilleur modèle pour travailler sur les maladies humaines.

- Le nombre de souris nécessaire à la réalisation de ce projet a été scrupuleusement réduit au minimum en tenant compte de nos 10 ans d'expériences en matière de cancérogénèse UVB induite. Pour ces raisons, nous avons déterminé via des tests statistiques qu'un lot de 15 souris par groupe était nécessaire pour avoir des données statistiquement exploitables à la fin de l'étude. Nous utiliserons également des lots témoins communs afin de réduire le nombre d'animaux utilisés. Les animaux qui ne répondent pas favorablement seront néanmoins utilisés pour des prélèvements de peau et serviront de contrôle pour des analyses ultérieures.

- Des études pilotes ont été réalisées pour raffiner l'ensemble de nos procédures expérimentales sur les animaux de manière à réduire au minimum les temps d'exposition, les temps de contention et d'isolement afin de prévenir toute souffrance ou angoisse chez nos animaux.

De plus, une surveillance des animaux et une évaluation de leur bien-être sera réalisée quotidiennement par les intervenants et le personnels qualifiés de l'animalerie afin de s'assurer que tout au long du projet les animaux sont en bonne santé, sans comportement anormal ou signes de souffrance. Si toutefois, une souris montre le moindre signe de souffrance ou d'inconfort, un antidouleur lui sera administré. Pour la réalisation de ce projet, nous avons également établie des mesures conservatoires et des points limites adaptés à chaque protocole et/ou situation nous permettant de prendre les décisions qui s'imposent face à la souffrance ou l'inconfort de nos animaux.

14608 Notre activité de recherche est focalisée sur le développement de traitements visant à corriger les troubles auto-immuns et autres défaillances du système immunitaire, ainsi que sur la mise au point de vaccins. Aucun test *in vitro* ne permet de caractériser un phénomène aussi complexe qu'une réponse immunitaire qui implique de nombreuses voies physiologiques. Le recours aux modèles animaux est donc indispensable. Ce projet vise à former et à maintenir les compétences des 12 utilisateurs de notre animalerie sur les gestes techniques couramment mis en œuvre au sein de notre établissement dans le cadre de projets autorisés par le MESR (administrations, injections et prélèvements). Il a été conçu en accord avec le principe de la règle des 3R (réduction, raffinement et remplacement).

Remplacement : Dans notre cas, nous nous focalisons sur le modèle murin. Il n'existe à ce jour aucun autre modèle alternatif (méthode *in vitro*) mimant aussi bien les signes cliniques des pathologies étudiées présents chez l'Homme. En effet, l'espèce souris est un modèle très utilisé en pathologie immunologique telle que l'allergie ou la vaccination en raison des nombreux outils mis à disposition pour l'analyse des réponses immunitaires. De plus, certains marqueurs de la réponse immunologique sont identiques entre l'Homme et la souris.

Raffinement : Ce projet s'inscrit pleinement dans le principe de raffinement. En effet, la formation des utilisateurs leur permettra d'acquérir une maîtrise parfaite de l'ensemble des gestes techniques mis en œuvre au sein de notre animalerie. Cette maîtrise technique permettra aux utilisateurs de réaliser des gestes rapides et précis, permettant ainsi de limiter le stress et la douleur chez les animaux utilisés dans d'autres projets, en cours ou à venir. Dans ce cadre, tout nouvel utilisateur de l'établissement sera encadré, accompagné et évalué par un utilisateur expérimenté. Par ailleurs, le bien-être des animaux sera également planifié, les animaux seront hébergés par groupes d'individus compatibles, dans des conditions contrôlées permettant ainsi leur bien-être telle que la mise en place d'une diversification du milieu (ajout de papier cartonné permettant la nidification, maisonnette, musique). Afin de réduire au maximum le stress des animaux, certains gestes techniques seront pratiqués sous anesthésie (locale ou générale)

Une surveillance quotidienne est réalisée sur tous les animaux. Toutes les observations (graduées par des points limites spécifiques liés à l'expérience) sont enregistrées dans des tableaux d'observation manuscrits, insérés au rapport d'étude.

Réduction : Le nombre d'animaux prévu pour les 5 ans de ce projet s'élève à 1300 souris au maximum. Cette évaluation du nombre d'animaux sera suffisante pour former tous les nouveaux utilisateurs et maintenir ou élever le niveau de compétence des utilisateurs actuels. Le fait que tous les utilisateurs maîtrisent parfaitement l'ensemble des gestes techniques permettra de limiter les biais expérimentaux et de générer des données très fiables. Cela permettra de limiter le nombre de répétitions pour les expériences réalisées dans le cadre d'autres projets scientifiques et ainsi de limiter le nombre d'animaux requis. Les points limites pris en considération pour cette étude sont le bien-être et l'état physique de l'animal avec utilisation d'un système de scores. Dans ce projet, nous utiliserons en partie des souris de réforme issues d'un élevage interne à l'établissement.

14609 De nombreuses études ont mis en évidence l'implication d'une surproduction de cytokines dans les maladies inflammatoires chroniques, telles que le psoriasis, la maladie de Crohn ou encore la polyarthrite rhumatoïde. Depuis près de 20 ans, des anticorps monoclonaux ciblant les cytokines, et plus particulièrement le TNF α , sont commercialisés. Ces traitements sont très efficaces mais présentent plusieurs inconvénients, tels que l'apparition d'effets secondaires comme des infections

ou une diminution de l'efficacité du traitement au cours du temps. Il est donc nécessaire d'élargir l'offre thérapeutique en proposant de nouvelles stratégies d'inhibition des cytokines et en particulier du TNF α .

Notre projet a pour objectif de développer des petites molécules chimiques ciblant spécifiquement le TNF α .

Nos composés seront produits par synthèse chimique et testés dans des modèles *in vitro* nous permettant d'étudier leur activité. Les quatre meilleurs produits seront ensuite évalués *in vivo* chez la souris. Dans un premier temps, la toxicité des molécules sera étudiée chez un nombre restreint de souris. Dans un deuxième temps, l'efficacité des molécules sera étudiée dans un modèle murin de choc hépatique afin d'évaluer l'impact des molécules sur le TNF α et le devenir des animaux. La fonction hépatique (enzymes du foie) ainsi que la production de cytokines seront analysées à partir de prélèvements sanguins suite à l'exsanguination des animaux réalisée sous anesthésie générale. Les molécules n'ayant aucun effet seront mises de côté. Les deux meilleures molécules, protégeant le plus efficacement les animaux contre le choc hépatique, seront, dans un troisième temps, testées dans un modèle murin d'arthrite au collagène mimant la polyarthrite rhumatoïde. L'induction de la maladie sera faite sous anesthésie générale. Les animaux seront suivis pendant 45 jours afin d'analyser l'évolution de la maladie chez les animaux traités par nos composés. Les animaux qui atteindraient les points-limites développés au laboratoire seront euthanasiés précocement. Nous nous attendons à une diminution des symptômes de l'arthrite.

Notre projet s'étend sur 5 ans et l'utilisation des animaux est indispensable car nous souhaiterions développer un produit de santé humaine où des preuves d'efficacité chez les rongeurs sont nécessaires avant de réaliser une transposition chez l'Homme. Une sélection minutieuse des composés est réalisée en amont (tests *in vitro* d'activité et études pharmacocinétiques) nous permettant de restreindre le nombre de composés à évaluer dans les modèles animaux (4 dans le choc hépatique, 2 dans l'arthrite au collagène) et par conséquent le nombre d'animaux. Le modèle de choc hépatique et le modèle d'arthrite au collagène sont incompatibles avec l'utilisation d'antalgiques, une surveillance accrue des animaux sera donc nécessaire afin d'intervenir au plus tôt en cas de souffrance de l'animal.

Nous avons travaillé avec un biostatisticien afin de définir le nombre nécessaire et suffisant d'animaux qui seront utilisés lors de ce projet. Des groupes de 10 animaux pour les différents modèles nous permettront d'obtenir des résultats significatifs en cas d'effet des composés. Des études préliminaires de toxicité sur animal avec effectif réduit nous permettront de conforter la non-toxicité des composés avant des études avec des effectifs plus importants. Chaque modèle sera précédé d'une mise au point et la poursuite des expérimentations sera discutée de manière collégiale. 895 souris seront nécessaires pour réaliser ce projet sur 5 ans, les effectifs pouvant fluctuer à la baisse si les résultats *in vitro* et/ou *in vivo* ne sont pas satisfaisants.

Des points-limites ainsi que des critères d'arrêt précis ont été développés au laboratoire au fur et mesure des années et seront utilisés afin de s'assurer du bien-être des animaux. Les procédures susceptibles d'engendrer de la douleur seront réalisées sous anesthésie générale. En cas de souffrance d'un animal ou de point-limite atteint, l'animal sera euthanasié.

Nous espérons que les résultats obtenus lors de ce projet nous permettront de montrer un effet de nos composés dans ces deux modèles animaux, ce qui pourrait entraîner, à terme, un élargissement de l'offre thérapeutique pour les patients atteints de maladies inflammatoires chroniques.

- 14610** L'étude des pathologies infectieuses et/ou inflammatoires chez les vertébrés a récemment évolué avec le développement des techniques d'imagerie intravitale. Ces techniques, non invasives, permettent d'imager les animaux sous anesthésie pour observer des processus biologiques complexes à l'échelle d'individus entiers. Il est alors possible de visualiser directement l'évolution d'une pathologie et d'évaluer l'efficacité de molécules thérapeutiques sur un même individu au cours de la maladie limitant par cela les analyses par prélèvement et le nombre d'individus par expérience.

Notre équipe travaille sur les pathologies virales qui touchent les espèces aquacoles et développe depuis plusieurs années des approches d'imagerie intravitale sur le modèle poisson zèbre. Organisme de petite taille, optiquement transparent lors des premiers stades de développement, il a permis de décrire finement les relations hôte-pathogène suite à l'infection par des virus ou des bactéries. Nous avons contribué à décrire les réponses immunitaires antivirales chez les poissons et à développer des outils largement utilisés dans la communauté scientifique. Notre plateforme de phénotypage du poisson zèbre est ouverte à la communauté scientifique pour l'étude de pathologies infectieuses et inflammatoires.

Dans la continuité des projets engagés et suite aux expériences réalisées en culture cellulaire, nos approches d'imagerie dynamique visent à valider le rôle d'antiviraux potentiels *in vivo* et à visualiser les interactions hôte-pathogène à l'échelle d'un organisme entier. Le but est de détailler les mécanismes cellulaires et moléculaires en intégrant les spécificités tissulaires (infection et immunité des muqueuses, du système nerveux,..) et d'intégrer les interactions entre les différents types cellulaires ce qui est en général impossible *in vitro*. Nos travaux visent donc à établir des outils de diagnostic de pathologies virales et des stratégies de criblage des molécules thérapeutiques pour contrôler l'infection et l'inflammation associée.

L'intérêt du modèle poisson zèbre est également lié à ses capacités de régénération et de cicatrisation des tissus, notamment par le contrôle de ses réponses inflammatoires. La compréhension des mécanismes engagés est primordiale pour tenter de transposer ces résultats à d'autres espèces.

Le présent projet repose sur deux procédures :

- 1) l'étude par imagerie dynamique de stratégies anti-infectieuses dans différents modèles de pathologies virales
- 2) l'étude par imagerie dynamique de stratégies anti-inflammatoires dans différents modèles de pathologies inflammatoires.

Les approches d'imagerie intravitale sont développées sur la base des résultats obtenus dans des modèles *in vitro*. Cette imagerie dynamique non invasive permet de réduire le nombre d'animaux par expérience puisque le même animal peut être observé à différents points de cinétique. Les observations sont menées dans un environnement adapté, régulé en température. Pour limiter le stress dû à la manipulation, les poissons sont anesthésiés et maintenus par une empreinte d'agarose mou, immergés en milieu liquide avec anesthésique tout au long de l'expérience. Lors des périodes d'incubation, les animaux sont gardés en lots et constituent les uns pour les autres un élément important d'enrichissement du milieu. Les différentes lignées cellulaires (modèles *in vitro*) disponibles au laboratoire sont utilisées chaque fois que cela est possible et nous avons ainsi spécifiquement développé des lignées cellulaires issues de poisson-zèbre au laboratoire.

Nous veillons à réduire les effectifs de poissons autant qu'il est possible tout en nous assurant d'obtenir des résultats significatifs.

Nos expériences pour le criblage d'anti-infectieux sont réalisées sur des poissons de 7 à 28 jours post fertilisation (jpf) pour l'étude d'infections aiguës ou pour le suivi d'infections chroniques ou persistantes. Les analyses d'imagerie dynamiques sont conduites dès 7 jours post fertilisation pour évaluer la présence du pathogène fluorescent et la réponse inflammatoire. Si le pathogène persiste, l'animal peut être anesthésié et ré-observé à 14, 21 et 28 jpf pour évaluer la progression de l'infection.

Les modèles inflammatoires sont de la même façon, développés sur des poissons de 7 à 28 jours. Les animaux sont suivis par imagerie après stimulation et peuvent être anesthésiés et ré-observés à différents temps post challenge pour suivre la cicatrisation et la régénération des tissus au site de l'inflammation.

Les expériences peuvent être complétées par des approches d'imagerie sur tissus fixés ou par des analyses transcriptionnelles. Dans ce cas, les prélèvements nécessaires à notre étude sont effectués post mortem.

Nous prévoyons d'utiliser au total de 720 poissons répartis sur les deux protocoles pendant une période de 5 ans.

Les analyses de stratégie antivirale comprendront l'imagerie dynamique de poissons traités par des molécules anti-infectieuses (180 poissons) ainsi que le suivi de poissons infectés invalidés génétiquement pour l'expression de gènes antiviraux candidats (120 poissons) à différents points de cinétique.

Les analyses de stratégie anti-inflammatoire comprendront l'imagerie dynamique de différents modèles de pathologies inflammatoires induites par stimulation (180 poissons) (exposition au cuivre, lésion mécanique ou lésion laser); pathologies liées à l'invalidation ou à la surexpression de gènes d'intérêt (240 poissons).

L'ensemble des procédures proposées ne pourrait donc pas être mis en œuvre uniquement dans des modèles *in vitro*, dans la mesure où les propriétés de sensibilité, ou de réponse aux infections sont exprimées à l'échelle de l'individu. L'imagerie *in vivo* des infections et des réponses inflammatoires constitue un intérêt majeur du modèle poisson zèbre pour nos projets.

14611 La dépression touche environ 350 millions de personnes dans le monde dont la moitié n'a pas accès à un traitement efficace (source rapport OMS 2012). La résistance aux antidépresseurs est de plus en plus décrite et par conséquent, il est important de trouver une alternative plus efficace pour les patients pharmaco-résistants. Ces dernières années, des progrès considérables ont été accomplis en stimulant électriquement (grâce à la stimulation cérébrale profonde) ou superficiellement (par la stimulation magnétique trans-crânienne répétée) des zones du cerveau qui présentent une activité déficitaire chez les personnes déprimées, induisant une rémission totale et durable chez des patients ne répondant à aucune pharmacothérapie. Cependant, la stimulation cérébrale profonde est une méthode très invasive à laquelle peu de patients acceptent d'avoir recours, et la discrimination spatiale de la stimulation magnétique transcrânienne est médiocre, ce qui en limite aussi l'utilisation. Récemment, il a été montré que la stimulation ultrasonore peut modifier l'activité électrique cérébrale, en étant très précise et non invasive. Cependant, cette méthode n'a pas encore été utilisée pour induire une réversion des états dépressifs.

L'objectif de cette étude sera donc de démontrer la faisabilité de la stimulation cérébrale par onde ultrasonore de régions précises du cerveau (comme par exemple le cortex cingulaire antérieur, le noyau accumbens ou l'habenula latérale) dans un modèle animal de dépression et si cette stimulation permet de reverser de façon durable les symptômes de la dépression. Cette étude vise à trouver une alternative de traitement chez des patients dépressifs pharmaco-résistants.

Ce projet vise à développer une alternative thérapeutique aux patients pharmaco-résistants. Pour cette expérience, 712 souris seront nécessaires.

En application de la règle des 3 R au modèle utilisé dans l'étude

Raffinement le stress appliqué aux animaux peut être qualifié de moyen. Les conditions d'élevage des animaux non stressés seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement du milieu. Les expérimentateurs sont experts dans la préhension/contention des souris et sont soucieux d'éviter tout stress lors de la réalisation des procédures. Afin de prévenir l'éventuelle douleur lors de l'injection un anesthésique local en gel sera appliqué au niveau du site d'injection. Les animaux recevront un traitement analgésique avant, juste après l'intervention, un traitement anti-inflammatoire 24-48 heures plus tard, puis si nécessaire un traitement antibiotique. Chaque animal est placé sur une couverture chauffante pour éviter toute hypothermie. Les cornées sont protégées de la déshydratation. L'anesthésie gazeuse est ici privilégiée pour mieux contrôler la profondeur d'anesthésie et pour une meilleure récupération post-opératoire. Une surveillance post-opératoire d'une semaine est réalisée pour suivre chaque souris et intervenir si nécessaire.

Remplacement aucune méthode alternative *in vitro* n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée. Le stress chronique chez l'animal, comme modèle de pathologie psychiatrique humaine, repose sur l'observation du comportement de l'animal vivant. Aucun marqueur cellulaire *in vitro* n'est disponible. De plus, les dosages biologiques requièrent des

prélèvements frais qui ne peuvent être réalisés que sur animaux sacrifiés avec délai post-mortem et conditions de prélèvement contrôlés.

Réduction les effectifs sont optimisés, les observations comportementales nécessitent une taille d'effectifs suffisante compte tenu de la variabilité inter-individuelle (n=15 sujets par groupe). De plus, la rationalisation des procédures permet d'optimiser l'utilisation des échantillons cérébraux prélevés.

14612 L'incontinence urinaire d'effort est définie comme une perte involontaire d'urine lors d'une augmentation de la pression intra-abdominale provoquée, par exemple, par une toux, un étternement, un effort physique, un rire. Elle semble liée à une insuffisance des muscles du plancher pelvien (alias périnée) et des tissus entourant le conduit urinaire (urètre). Chez la femme, ce type d'incontinence est assez fréquent dans diverses situations grossesse en cours, nombre de grossesses antérieures, activités sportives, obésité, boissons en grande quantité, consommation importante d'alcool ou de caféine. L'incontinence urinaire d'effort est aggravée par certains médicaments, en particulier psychotropes, hormonaux ou diurétiques. Quand l'efficacité des techniques de rééducation des muscles pelviens est insuffisante et la gêne importante, la chirurgie (pose d'une bandelette sous-urétrale en premier choix) est à discuter au cas par cas, en raison d'effets indésirables de l'acte chirurgical parfois plus invalidants que l'incontinence urinaire. Malheureusement, les médicaments utilisés dans le traitement de l'incontinence urinaire d'effort ont tous une balance bénéfices-risques défavorable. Dans ce contexte, la recherche préclinique est très active afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et de nouveaux médicaments qui soient efficaces et dépourvus d'effets indésirables pour le traitement de l'incontinence urinaire d'effort chez la femme.

Le but de ce projet est de tester des médicaments déjà connus ainsi que de nouvelles molécules sur la fonction uréthrale chez le rat femelle. Pour cela, il sera d'abord nécessaire d'induire la pathologie chez l'animal car chez le rat cette pathologie ne s'installe pas toute seule. Nous utiliserons donc un modèle expérimental d'Incontinence Urinaire d'Effort qui a été décrit en littérature, en appliquant une distension vaginale pendant des temps prédéfinis sous anesthésie générale. Ensuite, les animaux seront suivis et étudiés à temps différents (0- 4 -10 -14 jours après la distension vaginale). A ces temps, un test de point de fuite sera réalisé, toujours sous anesthésie, un exerçant une pression à niveau de l'abdomen jusqu'à provoquer une fuite urinaire. En parallèle, nous utiliserons des animaux contrôles, n'ayant pas eu une distension vaginale, afin de déterminer la différence de pression abdominale entre les animaux contrôles et pathologiques. D'autres animaux seront traités avec un candidat médicament ou son solvant, toujours aux temps 4-10-14 jours post distension vaginale, afin de quantifier l'efficacité d'un traitement pharmacologique sur la pression abdominale au point de fuite.

Notre protocole expérimental respecte le principe des 3R (Réduction, Raffinement et Remplacement). Pour la Réduction du nombre d'animaux, le design de l'étude est un plan d'expérience contrôlé en mesures répétées, le nombre d'animaux est réduit à 12 animaux par groupe, et le nombre de groupes sera de 8. Pour ce qui concerne le Raffinement, nous avons prévu d'enrichir les cages d'hébergement par des tunnels en plastique rouge et par des barrettes de bois à ronger, afin de diminuer le stress des rats. De plus, tous les protocoles expérimentaux seront réalisés sous anesthésie générale (d'abord isoflurane, ensuite uréthane par voie intraveineuse) et chaque rat sera posé sur un tapis chauffant à 37°C afin d'assurer la température corporelle physiologique. A la fin de la distension vaginale, un antalgique morphinique (Buprecare) à la dose de 0.05 mg/kg s.c. sera administré. Afin d'éviter l'assèchement de la cornée pendant l'anesthésie, les yeux seront traités avec un gel oculaire (Lubrithal).

Le suivi quotidien des animaux permettra d'identifier tout signe de douleur ou de souffrance nécessitant une intervention la plus précoce possible. L'examen clinique des animaux permettra d'évaluer plusieurs paramètres de santé et bien-être. Nous allons observer des signes comportementaux (perte d'appétit, perte de poids, diminution du comportement exploratoire, fuite ou défense à la manipulation, vocalises, automutilation dans les cas graves) ainsi que les apparences (hérissément du poil, pelage terne, expression faciale ou regard modifié, yeux mis clos,

posture inhabituelle) et les signes cliniques (augmentation ou diminution de la fréquence de respiration, cyanose). Les points limites, conduisant à une euthanasie seront les suivants : perte de poids de plus de 20%, dos voûté, yeux fermés, poils hérissés, essoufflement, immobilité, état moribond. L'euthanasie sera réalisée par dislocation cervicale sous anesthésie à l'isoflurane.

Pour ce qui concerne le Remplacement, les tests *in vitro* n'étant pas probants, l'utilisation d'animaux de laboratoire vivants est absolument indispensable pour valider cette étude.

Le nombre d'animaux sera de 384 par an, donc 1920 sur 5 ans.

14613 Notre projet a pour but d'étudier une approche thérapeutique novatrice visant à améliorer le traitement des patients atteints d'un gliome.

Le gliome est la tumeur cérébrale primaire la plus fréquente chez l'homme, troisième cause de mortalité chez l'adulte jeune et deuxième cancer le plus fréquent chez l'enfant. Extrêmement invasif, le gliome présente une survie à 5 ans de 10% chez les patients atteints des formes les plus agressives. Après diagnostic, le traitement lourd de ces tumeurs consiste à la résection chirurgicale de la tumeur couplée à un traitement de chimiothérapie et de radiothérapie.

Le succès d'une thérapie du cancer dépend, entre autres, de la structure vasculaire de la tumeur. Parallèlement, il est admis que certains sous-types de cellules immunitaires dans les tumeurs favorisent la résistance à la thérapie des cancers. Nous étudions un mécanisme cellulaire (signalisation Slit-Robo) récemment associé à un mauvais pronostic chez les patients atteints de gliome, et dont l'inhibition pourrait bénéficier la survie des patients.

Seule l'expérimentation *in vivo*, mimant le plus fidèlement possible le microenvironnement tumoral, permettra de déterminer le mécanisme d'action de Slit-Robo.

Dans une première étude, nous développerons des modèles de souris transgéniques dans lesquels les molécules Slit et Robo seront absentes des cellules vasculaires, immunitaires ou tumorales. Des cellules tumorales de gliome seront implantées dans ces souris et l'évolution de la tumeur et de son environnement sera suivie au cours du temps pendant 5 semaines par microscopie *in vivo*. Outre ses avantages en termes d'imagerie, l'utilisation de cette technique permettant de suivre le même animal au cours de la progression tumorale limite grandement le nombre d'animaux nécessaires à l'étude.

Dans une seconde étude, le même protocole sera appliqué à des souris non transgéniques traitées par un nouvel agent thérapeutique, seul ou en combinaison avec une chimiothérapie classique. L'effet de ces traitements sur la croissance et le microenvironnement tumoral fourniront des pistes pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques chez l'homme.

Le nombre d'animaux utilisés au cours de ce projet est évalué à 1600 souris sur 5 ans.

Réduction : Pour réduire le nombre d'animaux, nous avons estimé la taille des échantillons permettant une analyse statistique efficace des résultats grâce aux données collectées au cours d'expériences précédentes. La technique d'imagerie *in vivo* choisie, qui permet de suivre le même animal au cours du temps, limite le nombre d'animaux nécessaires à l'obtention de résultats.

Remplacement : L'identification des cellules cibles de Slit-Robo *in vivo* chez la souris permettra de remplacer les études *in vivo* par des études *in vitro* utilisant ces cellules en culture.

Raffinement : Les animaux seront particulièrement surveillés lors de ces procédures. Afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse des souris, les greffes de tumeurs et l'imagerie *in vivo* se dérouleront sous anesthésie générale et sur tapis chauffant et des antalgiques pré- et post-opératoires sont prévus. Des points-limites ont été établis, entraînant l'arrêt anticipé de l'expérience sur un animal si nécessaire.

Ce projet, qui a reçu le soutien de l'ARC, devrait aider à mieux comprendre les interactions vasculaires/immunitaires au cours de la progression tumorale et à proposer de nouvelles approches thérapeutiques pour les gliomes. Les résultats obtenus pourraient être élargis à d'autres types de tumeurs, en particuliers à celles connues pour échapper aux chimiothérapies anti-angiogéniques actuellement disponibles.

14614 Le diabète de type 2 (DT2) touche 90% des personnes diabétiques, principalement au-delà de 40 ans, souvent en surpoids ou obèse, qui ont un régime alimentaire déséquilibré (trop riche en gras et en sucres) et/ou dont l'activité physique est insuffisante. Cette maladie métabolique est caractérisée par un excès chronique de sucre dans le sang (hyperglycémie), définie par une glycémie supérieure à 1,26 g/l à jeun. Parmi les nouveaux axes de recherche pour traiter le DT2, émergent des alternatives thérapeutiques, préventives et curatives. Parmi ces alternatives thérapeutiques, la tradithérapie offre un panel de substances naturelles méconnues dont les effets n'ont été que très peu caractérisés de façon préclinique et clinique, bien qu'elles soient, localement, couramment utilisées par l'Homme. Ainsi, deux plantes médicinales ont été identifiées comme ayant des caractéristiques phytochimiques intéressantes pour prévenir et traiter le DT2 (ces plantes sont nommées ici MA et AA pour des raisons confidentielles, leur utilisation faisant l'objet d'un dépôt de brevet d'invention. Ce projet vise à poursuivre des études préliminaires sur les plantes MA et AA qui permettent d'améliorer l'hyperglycémie chez le rat diabétique par deux actions lors d'un traitement chronique augmentation de la sensibilité à l'insuline des tissus cibles et amélioration de la sécrétion d'insuline en réponse à une stimulation par le glucose *in vivo* et *in vitro* (îlots isolés).

Spécifiquement, le but du projet sera d'établir chez l'animal diabétique :

- 1) Si le traitement par MA ou AA présente un effet-dose sur l'amélioration de la glycémie et de comparer ce traitement chronique à des anti-diabétiques déjà sur le marché. Jusqu'à présent l'extrait de plante a été administré à une seule dose, mimant celle prise traditionnellement chez l'Homme.
- 2) Si une unique dose de la plante est suffisante pour améliorer la tolérance au glucose
- 3) Si les fractionnements successifs des composés de la plante reproduisent les effets anti-diabétiques observés, en vue d'isoler le(s) principe(s) actif(s)

Pour cela, une combinaison de stratégies d'expérimentation animale *in vivo* sera utilisée sur 72 rats (pour pouvoir comparer l'effet-dose aux résultats déjà obtenus sur ce modèle) puis 520 souris sur la dose optimale qui aura été déterminée chez ces rats (changement d'espèce de rongeur mais modèle diabétique identique (mutation spontanée) afin de réduire les coûts et l'occupation spatiale dans l'animalerie sur une période de 3 ans.

L'étape de caractérisation des effets sur la sécrétion d'insuline a déjà été faite sur des lignées de cellules pancréatiques mais les effets sur les autres organes insulino-sensibles et sur la sécrétion des incrétines intestinales sont indispensables à caractériser.

Le but de ce projet est d'étudier l'effet curatif de deux plantes aux propriétés anti-diabétiques qui agissent à plusieurs niveaux de l'organisme tissus insulino-sensibles, intestin et pancréas seul l'animal entier peut être utilisé pour préserver la séquence des effets sur l'organisme. Aucun modèle *in vitro* ne peut être utilisé en remplacement.

Le nombre d'animaux sera réduit au mieux grâce à l'utilisation de tests statistiques (logiciel « G-Power » permettant de calculer le nombre minimum d'animaux permettant une représentation de la population et suffisant pour détecter des différences significatives (puissance de 80% avec un risque alpha de 5%). Toutes les précautions possibles seront prises afin de raffiner nos procédures et réduire au mieux l'inconfort des animaux (habituation, enrichissement des cages, utilisation d'anesthésique et d'antalgique, surveillance de l'état du poil et des postures des animaux). De plus, le personnel impliqué est formé et possède une solide expérience.

14615 Le virus Puumala (PUUV) est un orthohantavirus appartenant à l'ordre des Bunyavirales et à la famille des Hantaviridae qui a été identifié et isolé dans les années 1980 en Finlande. Son réservoir naturel et spécifique est le campagnol roussâtre (*Myodes glareolus*). Il s'agit d'une des espèces de micromammifères la plus largement répandue en Europe. Le virus peut se transmettre entre les rongeurs soit par voie directe (par morsure via la salive) soit par voie indirecte (inhalation d'aérosols à partir des excréta de campagnols infectés). Chez le rongeur, l'infection PUUV est décrite comme asymptomatique. PUUV peut aussi se transmettre du rongeur à l'Homme principalement par voie indirecte. Chez l'Homme, PUUV est responsable d'une maladie infectieuse, la néphropathie épidémique (NE), une forme atténuée de fièvre hémorragique à syndrome rénal (FHSR). Selon les

individus, les symptômes cliniques peuvent varier allant d'une forme asymptomatique à une infection grave voire mortelle. En effet, dans quelques rares cas, des complications peuvent survenir au cours de la maladie aboutissant à des défaillances rénales.

En Europe, la NE est devenue un problème sanitaire de premier ordre en raison d'une nette expansion géographique et d'une augmentation du nombre de cas recensés chaque année. En France, on recense en moyenne une centaine de cas de NE chaque année. Ces cas se concentrent uniquement dans le quart nord-est du pays (de l'Isère au Pas de-Calais) avec des foyers de transmission plus ou moins actifs malgré la présence du réservoir de PUUV sur l'ensemble du territoire (excepté la côte méditerranéenne). De nombreux facteurs sont impliqués dans cette différence de répartition des cas de NE dont la variabilité virale, qui est un des facteurs les moins étudiés à ce jour. Une meilleure compréhension du risque d'émergence de la NE est donc essentielle.

Aujourd'hui, le modèle de rongeur utilisé pour l'étude du virus Puumala est son hôte naturel : le campagnol roussâtre. En Europe il existe peu de colonies captives de cette espèce. Par conséquent les captures en milieu naturel sont fréquentes. Ce projet a pour but d'essayer d'obtenir des résultats expérimentaux sur la lignée IFNAR identiques à ceux obtenus précédemment à partir de l'hôte naturel. A ce jour aucune lignée murine n'a pu être infecté par le virus Puumala. Nous avons choisi d'étudier la lignée IFNAR car elle présente une délétion du récepteur de l'interféron gamma impliqué dans la médiation des réponses immunitaire précoces face aux agents pathogènes. Cette modification a déjà montré l'augmentation de la sensibilité aux infections virales de cette lignée mais pas encore pour le virus Puumala. Cette approche si elle est validée permettra de réduire notablement les prélèvements de rongeurs en milieu naturel.

Ce projet qui s'étalera sur 5 ans utilisera 420 animaux soit 84 animaux par an. L'approche statistique nous a permis de définir à 12 le nombre d'individus nécessaires pour obtenir un résultat significatif sur la variable étudiée. Ainsi, chaque année nous étudierons 6 variables ($6 \times 12 = 72$) associée à 2 animaux témoins par variable ($2 \times 6 = 12$). Ces animaux seront hébergés dans un environnement enrichi. La procédure expérimentale consistera à évaluer la cinétique du virus dans cette lignée afin de comparer ces résultats à ceux préalablement obtenus chez le campagnol roussâtre. Si contrairement à nos attentes des signes cliniques surviennent, les animaux sont suivis deux fois par jour par des personnes sensibilisées aux symptômes usuellement associés à une infection virale (hyperthermie, perte de poids, d'appétit, modification motrices ou comportementale) et pourront détecter rapidement des animaux en souffrance et décider d'un traitement approprié. Lors des prélèvements, les souris seront toutes anesthésiées à l'isoflurane pour éviter tout inconfort.

14616 La dépression touche environ 350 millions de personnes dans le monde dont la moitié n'a pas accès à un traitement efficace (source rapport OMS 2012). La résistance aux antidépresseurs est de plus en plus décrite et par conséquent, il est important de trouver une alternative plus efficace pour les patients pharmaco-résistants. Ces dernières années, des progrès considérables ont été accomplis en stimulant électriquement (grâce à la stimulation cérébrale profonde) ou superficiellement (par la stimulation magnétique trans-crânienne répétée) des zones du cerveau qui présentent une activité déficitaire chez les personnes déprimées, induisant une rémission totale et durable chez des patients ne répondant à aucune pharmacothérapie. Cependant, la stimulation cérébrale profonde est une méthode très invasive à laquelle peu de patients acceptent d'avoir recours, et la discrimination spatiale de la stimulation magnétique transcrânienne est médiocre, ce qui en limite aussi l'utilisation. Récemment, il a été montré que la stimulation ultrasonore peut modifier l'activité électrique cérébrale, en étant très précise et non invasive. Cependant, cette méthode n'a pas encore été utilisée pour induire une réversion des états dépressifs.

L'objectif de cette étude sera donc de démontrer la faisabilité de la stimulation cérébrale par onde ultrasonore de régions précises du cerveau (comme par exemple le cortex cingulaire antérieur, le noyau accumbens ou l'habenula latérale) dans un modèle animal de dépression et si cette stimulation permet de reverser de façon durable les symptômes de la dépression. Cette étude vise à trouver une alternative de traitement chez des patients dépressifs pharmaco-résistants.

La partie imagerie TEP de ce projet se fera sur 256 souris.

En application de la règle des 3 R au modèle utilisé dans l'étude

Raffinement Les conditions d'élevage des animaux non stressés seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement du milieu. Les différentes procédures seront réalisées sous anesthésie.

Remplacement aucune méthode alternative *in vitro* n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée.

Réduction les effectifs sont optimisés, l'imagerie TEP nécessite une taille d'effectifs suffisant compte tenu de la variabilité inter-individuelle (n=8 sujets par groupe).

14617 Les pathologies infectieuses constituent une menace pour le développement durable de l'aquaculture. Ces dernières années, de nombreuses publications scientifiques ont démontré l'existence chez les poissons d'une variabilité génétique sélectionnable et utilisable pour mettre en place des stratégies de lutte contre les agents pathogènes. Ce projet s'inscrit dans le cadre de la création d'une plateforme collaborative associant des partenaires publics et privés dont l'objectif est l'amélioration génétique de la résistance des poissons d'élevage, et principalement des trois espèces piscicoles françaises majeures (truite, bar, daurade), à différents agents infectieux. La stratégie déployée consistera à sélectionner des individus d'intérêt au sein de populations commerciales en se basant sur la valeur génétique familiale de leurs frères-sœurs infectés expérimentalement en conditions contrôlées. L'ensemble des individus infectés expérimentalement (morts et survivants) sera génotypé au terme des procédures expérimentales. L'analyse des mortalités quotidiennes et des taux de survie permettra de déterminer l'héritabilité de la résistance pour chacun des pathogènes testés, de tester de nouvelles approches (type puce à ADN) visant à identifier les zones génomiques impliquées dans la résistance et d'améliorer progressivement la survie moyenne des populations de poissons. Les retombées attendues à terme sont une amélioration du bien-être des animaux et de la résistance des lignées commerciales, une diminution des coûts de production et de l'usage de produits médicamenteux, ainsi qu'une avance technologique des entreprises françaises face aux investissements publics étrangers concurrents dans un secteur très compétitif.

Le présent projet porte sur la réalisation de 22 challenges expérimentaux sur 5 couples poissons - pathogènes bars / Nodavirus, bars / *Vibrio harveyi*, daurades / *Photobacterium piscicida* subsp. *damselae*, truites arc en ciel / Virus de la Septicémie Hémorragique Virale et truites arc en ciel / virus de la Nécrose Pancréatique Infectieuse.

Le nombre de poissons nécessaire sera de 53 000 juvéniles (12 500 truites, 33 750 bars et 6 750 daurades). Celui-ci est calculé selon les plans expérimentaux conçus par le SYSAAF et réduit au seuil de la pertinence statistique et scientifique pour les approches utilisées.

Le critère de mortalité utilisé pour identifier les individus d'intérêt et répondre aux objectifs fixés ne permet pas de remplacer les animaux par des méthodes *in-vitro* ni de fixer de points limites. Les procédures expérimentales ont été élaborées afin de réduire au maximum leur nombre et de les placer dans des conditions d'hébergement optimales (volume d'eau adapté avec renouvellement en continu, rythme jour/nuit, suivi quotidien des animaux deux fois par jour,).

14618 Le risque de mort subite chez les patients épileptiques (SUDEP) est trois fois plus élevé que chez les personnes saines. Il existe un modèle de choix de SUDEP chez la souris correspondant à une crise épileptique induite par un stimulus sonore et possiblement suivi du décès (crise audiogène ou AGS pour « audiogenic seizures »). C'est un modèle de choix parce qu'il n'est absolument pas invasif ni systémique à la différence d'un modèle électrique ou pharmacologique. L'inconvénient de ce modèle réside dans le fait que toutes les souris ne répondent pas à la stimulation.

Des travaux ont montré qu'un enrichissement en oxygène du milieu ambiant permettait de protéger contre le décès d'une souris lors d'une crise audiogène. Fort logiquement, on doit s'attendre à une létalité accrue lorsque l'animal présente une crise d'épilepsie dans un milieu appauvri en oxygène.

Notre projet vise à évaluer

1/ si des crises audiogènes pratiquées dans un milieu appauvri en oxygène (O₂) permettraient de réduire significativement la proportion de souris ne répondant à la stimulation. Quatre groupes de 12 souris seront constitués. Sachant que l'environnement normal en O₂ est de 20,8 %, un groupe sera exposé à un environnement à l'air ambiant, et les trois groupes traités à 16 %, 12 % et 8 % en O₂. Le taux d'O₂ sanguin sera contrôlé sur chaque souris testée par un capteur positionné sur la queue. Ce protocole sera appliqué à deux lignées de souris. Nous testerons donc 96 souris durant cette phase 1.

2/ ensuite, nous inclurons 12 souris de chacune des deux lignées avec des électrodes cardiaque, vagale et électroencéphalographique dont nous mesurerons les activités en situation de crise audiogène en milieu appauvri en O₂ à une valeur déduite de l'expérience initiale. Il s'avère que l'approche chirurgicale reste complexe. Nous estimons qu'il sera nécessaire d'instrumenter au maximum 24 souris, pour chacune des deux lignées, pour obtenir 12 souris à inclure. Nous testerons donc au maximum 48 animaux pour cette phase 2.

L'ensemble des deux phases nous amènera donc à tester au maximum 144 animaux (et 120 animaux au minimum).

Par cette étude, nous ambitionnons de montrer que la teneur en O₂ de l'air ambiant reste cruciale pour le pronostic fatal d'une crise d'épilepsie. Et lorsque l'issue est fatale, elle est précédée par une activité du nerf vague conséquente. La souris supportant bien mieux l'hypoxie que l'être humain, nous n'identifions pas de points faibles autres que ceux relatifs à la difficulté de l'approche chirurgicale.

Concernant la règle Remplacement-Réduction-Raffinement, il n'est pas envisageable d'utiliser une approche in-vitro en remplacement de l'approche in-vivo puisque le trait évalué correspond à la réponse mettant en jeu tout un processus physiologique intégré chez un sujet respirant. Chez la souris, l'hypoxie n'entraîne pas de processus toxiques tant que la valeur est supérieure ou égale à 8 % et tant que l'exposition n'est pas extrêmement prolongée. Nous avons choisi 3 valeurs d'hypoxie au-dessus de la limite de toxicité (≤ 8 %) à la valeur normale du groupe contrôle (20,8 %). Ceci nous permettra d'établir une courbe-dose nous permettant de réduire les groupes à 12 sujets, valeur jugée comme minimale de par notre expérience pour évaluer un pourcentage de réponse à un stimulus convulsivant. Enfin, notre protocole suit des procédures standardisées soucieuses de minimiser le stress et toute souffrance des animaux avec une détermination précise des points limites. Ceci se traduit par une visite quotidienne à l'animalerie pour contrôler le bien-être des animaux, l'enrichissement des cages, le respect des normes liées aux surfaces/volumes des cages pour éviter la surpopulation ainsi que celles liées aux plages acceptables pour la température et l'hygrométrie. En cas, de poses d'électrodes cérébrales, les animaux bénéficieront d'anesthésique, d'analgésique et d'anti-inflammatoire.

14619 L'hémophilie B (déficit en facteur IX (FIX) est une pathologie grave de l'hémostase. Les formes sévères de la maladie, avec un taux de FIX < 1%, conduisent à des manifestations hémorragiques souvent spontanées et localisées principalement au niveau des articulations (hémarthroses). Les hémarthroses à répétition sont responsables d'hypertrophies de la membrane synoviale (synovite), d'une dégradation progressive du cartilage et au long terme d'arthropathie hémophilique responsable d'handicap physique et de douleurs chroniques.

Le traitement de choix est la prophylaxie par injection intravasculaire de FIX. Initiée précocement elle a montré son efficacité dans la protection contre l'arthropathie hémophilique et la prévention des accidents hémorragiques graves.

Il a été montré que le FIX, via sa capacité à se lier au collagène de type IV, diffuse dans le secteur extravasculaire. Une étude récente sur des souris mutées « knock-in K5AFIX » avec liaison au collagène IV altérée, suggère que le FIX extravasculaire pourrait avoir un rôle fonctionnel hémostatique surtout contre la protection des re-saignements tardifs. Cette propriété peut être particulièrement intéressante si le FIX diffuse jusqu'aux synoviales situées au niveau des articulations, sites majeurs de saignements chez les hémophiles sévères.

Des travaux réalisés chez des souris, ont récemment rapporté que le facteur VII, une autre protéine de la coagulation, de structure et poids moléculaire similaires au FIX, s'accumulait en partie au niveau de l'os et du cartilage après injection. Une étude similaire, chez les rats, a rapporté que le FIX pouvait aussi s'accumuler dans l'os.

La bio-distribution du FIX au niveau articulaire a été peu étudiée à ce jour. Pourtant, ce dernier point présente un intérêt thérapeutique, puisque les nouvelles molécules de FIX à demi-vie prolongée ont un poids moléculaire supérieur au FIX sauvage. La liaison de ces nouvelles molécules avec le collagène IV n'a pas encore été étudiée et leur bio-distribution est peu connue.

Il semble donc intéressant d'étudier à la fois la distribution du facteur IX (forme sauvage et formes à demi-vie prolongée) au niveau articulaire ainsi que son effet protecteur local potentiel contre les hémarthroses.

Objectifs scientifiques et/ou perspectives d'application médicale

1) déterminer la bio-distribution du FIX sauvage et de 2 autres molécules de FIX à demi-vie prolongée avec une attention particulière pour les articulations

2) mettre en évidence l'effet potentiel du FIX intra-articulaire dans la prophylaxie des hémarthroses
Le projet prévoit 110 souris hémophiles B.

Un protocole d'arthropathie hémophilique standardisé chez les souris hémophiles a déjà été mis au point. Le protocole consiste à effectuer un traumatisme sur un genou de souris hémophiles par la ponction à l'aide d'une aiguille, sous anesthésie générale, avec prise en charge de la douleur post-traumatisme par un anti-douleur (morphinique). Ce traumatisme entraîne une hémarthrose dans 95% des cas. Par analogie avec la survenue d'une hémarthrose chez le patient hémophile, un traitement antalgique sera donné pendant au moins 5 jours par un analogue de morphine. Nous allons utiliser ce modèle pour évaluer l'efficacité du FIX présent dans l'articulation contre le saignement articulaire.

Il est important de préciser que la souris hémophile, paradoxalement à la forme humaine de cette altération génétique, n'est pas victime de saignement spontané et tout saignement provoqué sur la souris hémophile est résolutif sans prise en charge particulière.

Afin d'obtenir des résultats les plus fiables possibles, ce projet répond aux mieux aux critères de remplacement, de réduction et de raffinement

1) Remplacement la souris est un modèle éprouvé, fiable et de nombreuses lignées hémophiles A et B sont disponibles

2) Réduction le nombre d'animaux utilisés dans ce projet sera réduit à son minimum sans compromettre la significativité statistique de l'expérimentation

3) Raffinement toutes les mesures seront prises pour préserver le bien-être de l'animal. Les conditions de l'élevage, de l'hébergement, des soins et des méthodes utilisées pour chaque étape de l'expérimentation se feront sous condition de minimiser douleurs, souffrance, angoisse et dommages durables que pourraient ressentir l'animal, ceci par recours à l'anesthésie adaptée et aux anti-douleurs.

Les expérimentateurs sont formés aux gestes impliquant un contact avec l'animal et à l'observation des signes cliniques fondamentaux, notamment dans le domaine de la coagulation. Toutes les personnes intervenant dans ce projet auront été préalablement formées à ces gestes.

14620 Les virus influenza A sont responsables de milliers de décès chaque année et constituent de ce fait un problème de santé publique. Dans les cas les plus sévères, la mort du patient est causée par une inflammation massive des voies aériennes induite par le virus, et provoquant un syndrome de détresse respiratoire aigu. Le modèle d'infection grippale par le virus influenza chez la souris reproduit très bien ces mécanismes inflammatoires et son emploi permet d'étudier en détail la réponse immunitaire développée en réponse à l'infection. Dans ce modèle infectieux, le virus grippal induit une pathologie marquée potentiellement mortelle pour la souris. Ce modèle pathologique permet de tester des stratégies antivirales (drogues, probiotiques, vaccins) en développement afin de valider leurs effets contre ce type de virus. Pour ce faire, nous disposons d'une collection de

virus humains et aviaires génétiquement modifiés afin d'être visualisables au sein de l'animal infecté. Ces virus permettent le suivi de la réplication virale *in vivo* grâce à un système d'imagerie intra-vitale. L'imagerie intra-vitale consiste à observer des processus biologiques et à quantifier des signaux lumineux provenant de l'animal vivant sans devoir l'euthanasier et de façon non-invasive. Ce système viral, associé à l'emploi de souris génétiquement modifiées pour des gènes de l'immunité, nous permet de caractériser la réponse de l'hôte par comparaison avec des souris ayant un génotype non modifié. L'emploi du modèle souris pour étudier les mécanismes pathologiques liés aux virus influenza est extrêmement puissant car il permet de comprendre la dynamique de l'inflammation pulmonaire et de suivre l'afflux de cellules immunitaires au niveau des voies respiratoires. Il permet ainsi de caractériser finement des éléments clés de la réponse de l'hôte qui peuvent être de futures cibles thérapeutiques. De telles expériences ne peuvent pas être réalisées sur des cultures cellulaires qui ne permettent pas de reconstituer les communications entre les différents organes. De plus, les paramètres respiratoires fréquences respiratoires, volumes respiratoires, bronchoconstrictions; ainsi que les paramètres sanguins pression partielle en oxygène, hypoxie; malgré de gros progrès réalisés dans le développement d'organoïdes respiratoires, ne peuvent encore aujourd'hui être quantifiés que sur l'animal. Une expérience type repose sur l'étude de lots de 10 animaux. L'estimation de l'emploi de souris pour ce protocole est de 80 expériences regroupant 3 lots de 10 souris, ce qui représente un total de 2400 souris pour l'ensemble du projet qui dure 5 ans. Cette estimation est réalisée en tenant compte des différentes souches virales (influenza d'origine aviaires et mammifères) ainsi que des mutants dépourvus de facteurs de virulence que nous produisons dans un but de compréhension des mécanismes pathologiques. En outre, plusieurs souches de souris sont également utilisées dans le cadre de ce protocole. Les animaux sont élevés en groupe sociaux dans des cages (5 animaux maximum dans une cage). Du papier absorbant ainsi que des tubes en carton sont ajoutés pour enrichir le milieu. Une attention particulière sera apportée à l'emploi d'un nombre minimal d'animaux tout en maintenant des effectifs compatibles avec l'analyse bio-statistique. L'état de santé des animaux sera l'objet d'une attention particulière, les souris seront surveillées tout au long de l'expérience et l'état pathologique sera évalué grâce à des critères stricts basés sur la perte de poids, la température corporelle ainsi qu'à l'établissement d'un score clinique approprié à la pathologie grippale. En cas de score clinique élevé, les animaux seront euthanasiés.

14621 La mucoviscidose est une maladie héréditaire monogénique autosomique récessive grave affectant chaque année un nouveau-né sur 4200 en France. Nos travaux de recherche visent à mettre au point un traitement curatif pour cette maladie. Nous voulons ici évaluer l'efficacité de transfert de gènes *in vivo* de formulations, issues de nos recherches, et préalablement testées de façon approfondie en conditions *in vitro*. Nos investigations nous ont permis de sélectionner 20 formulations lesquelles représentent des candidates parmi les plus intéressantes à tester à l'heure actuelle.

Dans le cas présent, les molécules testées correspondent à des vecteurs synthétiques et les cellules cibles sont celles des bronches. Ceci implique d'effectuer des tests en conditions *in vivo* afin de prendre en compte toutes les contraintes liées à la complexité des voies respiratoires pulmonaires lesquelles ne peuvent être reproduites en conditions *in vitro*. La méthode d'administration utilisée consiste à délivrer les formulations à tester sous la forme d'un aérosol pouvant être respiré. Les molécules testées peuvent ainsi interagir directement avec les voies respiratoires, en particulier avec les cellules cibles à traiter.

L'espèce animale de référence pour ce type d'étude est la souris. Elles y respirent un aérosol formé à partir des agents de transfert de gènes à tester. L'administration par aérosol est une stratégie adaptée pour un traitement de maladie telle que la mucoviscidose; elle pourrait être rapidement transposée à la clinique, en particulier du fait que le matériel utilisé pour générer l'aérosol (le nébuliseur) est déjà utilisé par des patients pour d'autres indications.

La procédure ne génère pas ou peu de stress, ce qui impacte positivement la qualité des résultats obtenus en réduisant en particulier la variabilité liée à l'administration et donc le nombre d'animaux qu'il est nécessaire d'inclure, en bon accord avec la règle des 3R. Le nombre total d'animaux

nécessaires pour la réalisation de ce protocole est de 315 souris ([20 formulations à tester * 5 animaux par temps * 3 temps] + 15 animaux « témoins »). Des souris pourront être placées dans des cages métaboliques afin d'obtenir des informations sur l'élimination de la formulation aérosolisée. Certains des animaux employés (20 au maximum) pourront intégrer le protocole IRM afin d'obtenir des résultats plus approfondis de la distribution de l'aérosol.

L'aérosol est une procédure expérimentale en adéquation avec la règle des 3R. Dans le cadre du remplacement, toutes nos expérimentations sont précédées d'une phase de test *in vitro* permettant de ne retenir que les molécules présentant les meilleures chances de succès. La réduction du nombre d'animaux est au maximum sans mettre en péril l'obtention de résultats statiquement exploitables. Ces expérimentations sont indispensables pour optimiser nos protocoles et nous permettre de faire un lien entre les résultats obtenus *in vitro* et un éventuel développement clinique. Le raffinement sera assuré notamment par des phases d'acclimatation, un enrichissement de l'environnement, un suivi quotidien des animaux ainsi qu'une gestion de la douleur suivant une échelle stricte et des points limites bien établis.

14622 Les dégénérescences rétiniennes affectent un nombre ne croissant de personnes dans une population mondiale vieillissante. Trouver des traitements efficaces pour contrer l'évolution de la maladie menant à la cécité est un enjeu crucial de santé publique.

Avec l'allongement de l'espérance de vie, la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est la première cause de cécité dans les pays développés : le glaucome arrive en deuxième position. Dans la DMLA, au niveau de la rétine, un dysfonctionnement de l'épithélium pigmenté (RPE) entraîne la dégénérescence des photorécepteurs, les cellules sous-jacentes qui captent la lumière et forment le message visuel. Dans le glaucome, les cellules ganglionnaires de la rétine (CGR) meurent, ce qui conduit à une cécité profonde et irréversible. En France, il y a environ 1 million de personnes atteintes de glaucome. La préservation des photorécepteurs et les CGRs représente donc un enjeu de santé majeur.

L'homéoprotéine Otx2 est exprimée dans trois types cellulaires dans la rétine le RPE, le photorecepteurs et les cellules bipolaires. Les CGRs n'expriment pas Otx2 mais elles internalisent la protéine issue d'autres cellules rétiniennes ou la protéine exogène.

Nous induirons l'expression d'anticorps anti-Otx2 localement, ce qui permettra de bloquer la protéine Otx2 extracellulaire et nous analyserons la survie des photorécepteurs dans la région de la rétine précise. Dans un deuxième temps, nous supprimeront l'expression locale d'Otx2 dans les photorecepteurs, RPE et bipolaires. Ces deux approches nous permettront de comparer l'activité d'Otx2 dans les cellules qui la expriment et ceux qui ne l'expriment pas dans la survie des photorecepteurs.

Dans un travail publié précédemment, nous avons pu montrer que l'Otx2 exogène peut augmenter la survie des RGC adultes abimées en culture cellulaire ainsi qu'après l'administration d'une toxine *in vivo*. Nous voulons maintenant examiner si la modulation de la membrane cellulaire peut augmenter l'efficacité de la homéoprotéine administrée par voie intraoculaire afin de potentialiser la protection des CGRs et de améliorer le traitement du glaucome.

L'utilisation du modèle animal est indispensable pour cette étude. L'activité rétinienne ne peut être mesurée par des tests *in vitro*.

Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries pour s'assurer du bien-être des animaux. Les animaux sont hébergés dans les conditions conformes à la réglementation. Les rongeurs bénéficieront d'une anesthésie générale fixe ou gazeuse pour les différentes procédures expérimentales et d'une anesthésie cornéenne lors des injections intraoculaires et les électrorétinogrammes. Une signalétique particulière des animaux en expérimentation est utilisée. Une observation quotidienne des animaux est effectuée.

Le nombre d'animaux utilisé est le minimum requis pour atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ».

Remplacer En parallèle des expérimentations sur l'animal, des études préalables *in vitro* ont déjà été effectuées pour tester les propriétés de la protéine Otx2.

Raffiner Nos conditions d'élevage incluent stabulation par 4-5 animaux, enrichissement du milieu, température et hygrométrie contrôlée et suivi quotidien des animaux. La majorité des procédures pourront générer un inconfort faible et de courte durée, mais non dommageable pour l'animal. Pour les procédures compromettant le bien-être de l'animal, un suivi rapproché permettra de détecter une souffrance potentielle et de décider du devenir de l'animal au cours de l'expérimentation, notamment par la mise en œuvre de point limites précoces et adaptés. [SEP]

Réduire Nous limiterons la taille des échantillons à ce qui est strictement nécessaire pour garantir une puissance statistique acceptable. Pour limiter le nombre d'animaux produits nous utiliserons indifféremment des animaux des deux sexes. Enfin, certaines procédures ne seront réalisées que dans le cas où les procédures et expériences précédentes auront donné des résultats les justifiant. Le nombre total de souris pour ce projet est 168.

14623 Les Leucémies Aiguës Lymphoblastiques T (LAL-T) sont des cancers très agressifs. Ce sont des pathologies rares avec 200 nouveaux cas par an en France, mais les rechutes sont fréquentes et habituellement fatales justifiant la recherche de nouvelles cibles d'intervention thérapeutique. Ainsi, chez les enfants de 2 à 10 ans la fréquence de rechutes est de 70%.

Le présent projet d'expérimentation animale s'inscrit dans un projet de recherche plus large de caractérisation moléculaire de l'évolution des LAL-T de l'enfant en rechute. Les résistances aux traitements qui entraînent les rechutes découlent d'une hétérogénéité moléculaire et cellulaire de la leucémie au diagnostic et d'une adaptation de la cellule leucémique durant les traitements. Grâce à une analyse de séquençage à l'échelle de la cellule unique (technologie « Single cell ») nous espérons mettre évidence les différentes cellules leucémiques présentes au moment du diagnostic et à l'origine de la rechute. En parallèle nous établirons des souris "avatar" afin de conserver et amplifier ces cellules leucémiques *in vivo*. En effet du fait du jeune âge des patients les échantillons primaires sont très précieux. De plus ces cellules ne peuvent pas être maintenues dans des conditions classiques de culture *in vitro*. Le principe des souris "avatar" repose sur l'injection intraveineuse de cellules issues de prélèvements sanguins de patients leucémiques dans des souris immunodéficientes NSG. Les cellules greffées vont proliférer et coloniser le sang de la souris. Les cellules tumorales seront ensuite prélevées congelées et injectées dans plusieurs souris. Ce modèle murin va nous permettre d'amplifier et de créer une biobanque de clones leucémiques qui sera ensuite utilisée pour des expériences *in vitro*, mais également pour tester *in vivo* de nouvelles molécules à visée anti-leucémique. Pour satisfaire au raffinement, les animaux sont hébergés dans un milieu enrichi en portoirs ventilés avec un suivi journalier. Un dosage par prise de sang permettra de suivre le développement de la leucémie et d'empêcher toute souffrance animale inutile. Pour satisfaire à la réduction, nous utiliserons à la fois les souris mâles et femelles. En terme de remplacement, l'évaluation *in vivo* de nouveaux traitements ne se fera qu'avec des composés sélectionnés *in vitro* pour leur activité anti-leucémique et leur absence de toxicité sur des cellules non leucémiques. Nous utiliserons au total et au maximum 660 souris NSG produites au laboratoire.

14624 L'hyperphagie - associée ou non aux dérèglements métaboliques- est généralement présente chez l'obèse, en particulier dans les phases de développement. Sous l'angle physiologique, sa mise en place résulte d'un désordre des signaux perçus par le système nerveux central. Parmi ces signaux, le glucose circulant est une information particulièrement importante de par la précision de sa régulation et sa rapidité d'action (quelques minutes). Ainsi, le glucose est une molécule prédictive en termes de signal de faim (initiation du repas) et de rassasiement (terminaison du repas). Ce projet vise à comprendre comment la détection centrale du glucose est modifiée chez le rat Zucker obèse, quels sont les acteurs moléculaires et cellulaires principaux qui sont impliqués dans cette dérégulation. Finalement, la part de ces acteurs à l'établissement du dérèglement de la prise alimentaire et du métabolisme sera mesurée. Le rat Zucker obèse et insulino-résistant possède une mutation génétique sur le gène du récepteur à la leptine. Ces rats sont obèses, hyperphagiques, hyperinsuliniques, hyperleptinémiques, hypercholestérolémiques, ils présentent un tonus

parasympathique élevé ainsi qu'une hypersensibilité hypothalamique au glucose en réponse à une faible dose de glucose (3mg/kg, inefficace chez le rat normal) conjointement à une hypoghrélinémie. Cette hypersensibilité serait due à une signalisation des espèces actives de l'oxygène des mitochondries trop élevée (mEAOs, sont produites dans les mitochondries par l'oxydation des nutriments).

Spécifiquement, le but du projet sera d'établir

1) les mécanismes mitochondriaux (cellulaires et moléculaires) sous-jacents à un dysfonctionnement de la fonction hypothalamique au niveau des neurones hypothalamiques (participant à la commande vagale de l'axe hypothalamo-pancréatique, impliquée dans la sécrétion d'insuline).

2) Quel rôle la ghréline joue-t-elle sur ces paramètres ? La ghréline est une hormone orexigène d'origine gastrique sécrétée lorsque l'estomac est vide. L'hypothèse de travail a été que la ghréline, et pourrait moduler la sensibilité de certains neurones à l'hyperglycémie en agissant sur les mitochondries de ces neurones, aussi bien sur leur morphologie que sur la signalisation moléculaire.

Le but de ce projet est d'étudier les altérations de fonctions physiologiques comme la régulation nerveuse de la prise alimentaire et la sécrétion d'insuline chez le rat Zucker obèse. Ces fonctions biologiques ne peuvent s'étudier que sur des animaux vivants. Aucun modèle *in vitro* ne peut être utilisé en remplacement.

Le nombre d'animaux sera réduit au mieux grâce à l'utilisation de tests statistiques montrant la différence entre plusieurs groupes. Toutes les précautions possibles seront prises afin de raffiner nos procédures et réduire au mieux l'inconfort des animaux (habituation, utilisation d'anesthésiques et antalgiques, enrichissement des cages).

Au total, 160 rats Zucker obèse mâles seront utilisés et 160 rats Zucker maigres (ou 160 rats Wistar).

14625 Le développement rapide des connexions de type WiFi et la quasi permanence des expositions aux radiofréquences émanantes des appareils de communication sans fil accroît les préoccupations du public sur leur dangerosité pour la santé et plus particulièrement sur le développement cérébral. En effet, le développement cérébral est un processus caractérisé par des étapes séquentielles, hautement chorégraphiées, les rendant particulièrement sensibles aux agents environnementaux. Dans ce contexte, l'exposition chronique au WiFi durant le développement pourrait altérer la prolifération, la migration, la différenciation des neurones et/ou la formation des réseaux neuronaux, ayant pour conséquence d'augmenter les risques d'apparition de pathologies neurodéveloppementales tels que des troubles attentionnelles avec hyperactivité, des désordres de types autistiques ou schizophréniques. Pour cela, ce projet utilise des souris swiss comme modèle préférentiel principalement en raison 1/du degré élevé de conservation des mécanismes de base du développement cérébral, de la distribution cellulaire et de la maturation cérébrale entre la souris et l'homme et 2/du développement relativement rapide du cerveau de souris. De plus, les mécanismes qui contrôlent le développement du cerveau ont été largement étudiés chez les rongeurs, et en particulier chez la souris. De plus, les caractéristiques comportementales (comportement social, l'apprentissage et la mémoire) de la souche swiss est proche des souris sauvages. Les signaux WIFI seront délivrés en continu, 24 heures par jour, du premier jour de gestation (E0) au 21^e jour après la naissance (P21). Les souris gestantes seront exposées corps entier à une dose 8 milliWatt/kilogramme (dose maximal autorisé pour le public). Les souris pourront se déplacer librement dans leur cage de stabulation pendant le temps d'exposition afin de réduire l'effet confondant du stress. Nous mettrons en œuvre des approches chirurgicales pour injecter des préparations d'ADN modifié permettant de visualiser les neurones corticaux et leurs connexions et permettre une étude anatomique du développement cérébrale. Parallèlement nous rechercherons des troubles comportementaux des animaux adultes ayant été exposés durant toute la gestation et jusqu'au sevrage par l'utilisation d'une batterie de test comportementaux réalisé sur un même animal pour mettre en évidence des troubles du comportement alimentaire, sociale, d'anxiété, de mémoire et de motricité. Pour cette étude, 182 souris gestantes, 700 embryons ou souriceaux issus

de ces souris et 50 mâles (dont 26 reproducteurs pour produire les souris femelles gestantes et 24 pour valider nos tests comportementaux) seront nécessaires, soit un total de 932 animaux. Nous analyserons les progénitures mâles et femelles en même temps pour exclure des effets sexes spécifiques. Afin de respecter la règle des 3R, des procédures seront développées de façon à réduire au maximum le nombre et l'inconfort des animaux. Notamment, dans un souci de respect du R de réduire, nous prévoyons un maximum de 3 souris gestantes par condition, ce qui permettra de faire des analyses statistiques cohérentes. Aussi, dans le respect du R de raffiner, un soin particulier sera accordé à l'observation des animaux et à leurs conditions d'hébergement, en particulier lors des périodes post chirurgicales et de mise bas. De plus, des traitements appropriés (anesthésie, anti-inflammatoire, anti-douleur) seront utilisés pour pallier la douleur associée aux opérations chirurgicales. En ce qui concerne le remplacement, il est important de noter que cette étude nécessite la visualisation et l'intégrité d'un réseau englobant différentes régions du cerveau et qu'il ne peut donc être réalisé sur des modèles *in vitro*.

14626 Ce projet vise à identifier de nouveaux agents de contraste et les nanoparticules et nanomicelles associées pour la délivrance de drogues dans des modèles murins, en utilisant la technologie de microscopie intravitale. Une fois mis au point, ces agents peuvent ensuite être utilisés pour différentes applications.

L'expérience consiste à injecter par voie intraveineuse à des souris soumises à une anesthésie générale un nouvel agent pour vérifier et valider sa circulation sanguine, sa clairance rénale et sa captation par les tissus, pour aboutir principalement dans les reins, le foie et dans la rate. La biodistribution dans le foie, la rate et les reins est généralement étudiée sur organe entier. Ces organes sont alors systématiquement prélevés sur les animaux anesthésiés. Dans la mesure du possible, les souris seront des animaux surnuméraires ou réutilisées de projets précédents, en parfait état de bien-être général. Si l'étude de la biodistribution sur organe entier n'est pas nécessaire, les animaux pourront être maintenus pour être réutilisés.

REDUCTION : Pour réduire le nombre d'animaux, la stabilité des nouveaux agents dans du sérum physiologique et du sang humain est vérifiée avant les injections aux animaux. Le nombre des souris est limité à 21 par an (7 par agent et 3 agents par an), soit 105 au total car il ne s'agit que d'études de biodistribution et non des études de toxicité dans la durée. Les animaux pourront être maintenus en vie pour une utilisation ultérieure à condition qu'ils aient pleinement retrouvé leur état de santé et de bien-être général.

RAFFINEMENT : Le projet est mis en œuvre dans un établissement utilisateur agréé. Tous les personnels impliqués ont des compétences validées pour les manipulations des animaux. L'espèce animale retenue correspond à un modèle expérimental largement documenté et correspond à l'espèce la plus pertinente. Les animaux seront hébergés dans un environnement contrôlé et observés régulièrement afin d'anticiper l'apparition des points limites fixés. La fréquence de surveillance des animaux sera adaptée à la cinétique expérimentale, impliquant si nécessaire l'arrêt des expérimentations. Les différents gestes sont réalisés sous anesthésie générale. La méthode de mise à mort des animaux est règlementaire et réalisée sous anesthésie générale.

REMPLACEMENT Les agents sont testés préalablement à leur injection. Aucun modèle *in vitro* ne permet d'atteindre les objectifs fixés. Pour atteindre les objectifs, la souris est un modèle approprié et bien validé. Les souris, très petits mammifères, ont une taille mieux adaptée pour les études en microscopie intravitale (positionnement sous l'objectif facile, et volume d'agent à tester très réduit).

14627 Dans notre alimentation quotidienne, en plus des macromolécules (lipides, protéines et glucides), notre organisme a besoin de micronutriments (vitamines et oligoéléments) ainsi qu'un nombre de microconstituants (caroténoïdes, stérols...). De nombreuses études sont consacrées aux micronutriments et microconstituants liposolubles (ML) car leur consommation est inversement associée à l'incidence de certaines pathologies (cancers aérodigestifs, maladies cardio-vasculaires, maladies oculaires et maladies dégénératives...). L'amélioration de leurs effets santé nécessite une connaissance approfondie de leur processus de digestion-absorption, afin d'optimiser leur biodisponibilité. L'efficacité d'absorption des ML est très variable et dépend de nombreux facteurs.

De récentes études ont montré que la solubilisation des ML dans des assemblages mixtes (micellaires mais aussi lamellaires...) composés des produits de digestion des lipides et des composants biliaries est l'étape limitante de l'absorption. Des expériences physicochimiques en cours, où trois types d'acide gras (AG) + monoglycéride (MG) sont testés, ont montré que le type et la concentration d'AG+MG influencent la structure des assemblages mixtes (micelles versus vésicules), ainsi que leur capacité de solubilisation des ML. L'objectif de l'étude *in vivo* est de montrer que la capacité de solubilisation de ces assemblages influence l'efficacité d'absorption des ML chez la souris. Pour ce faire, 6 types d'assemblages, formés avec 3 types d'AG+MG à faible et forte concentration et incorporant pour chaque microconstituant la même quantité de microconstituants, sont infusés à des souris ayant les voies biliaries ligaturées. Une étape de quantification par HPLC des ML aux différents segments de l'intestin permettra de confirmer le lien entre la structure, la capacité de solubilisation des assemblages et leur efficacité d'absorption. Le nombre total de souris utilisées dans cette étude sera 180 souris.

Cette étude prend en compte la règle des 3Rs

Remplacement : A l'heure actuelle, aucune méthode de substitution *in vitro* ne permet d'étudier avec autant de précision l'absorption intestinale des micronutriments liposolubles. La souris est un modèle de choix car elle présente un système de digestion et d'absorption proche de celui de l'homme. Ainsi, le recours au modèle animal demeure la meilleure approche pour étudier l'absorption intestinale des micronutriments liposolubles.

Réduction Pour chacune des conditions, et compte tenu de la variabilité interindividuelle existant chez la souris, des groupes de 6 individus seront utilisés. Le nombre d'animaux utilisé dans cette étude est le minimum nécessaire pour assurer la validité statistique des phénomènes observés.

Raffinement Tous les actes invasifs seront réalisés sous anesthésie générale à la kétamine/xylazine (90/10 mg/kg). Les animaux seront hébergés en cage de 2 à 4 individus et l'environnement sera enrichi par la présence d'un igloo et de nid végétal tout au long de l'expérimentation. Les animaux auront accès ad libitum à la nourriture et à l'eau jusqu'à 4 heures avant le début de l'expérimentation. Un délai minimum de 7 jours d'acclimatation des souris sera respecté.

14628 L'objectif scientifique de ce projet est de caractériser des facteurs de virulence du virus influenza A. Le virus influenza A est l'agent infectieux responsable de la grippe. Il affecte l'homme mais aussi les animaux. Les facteurs de virulence qui sont étudiés dans ce projet sont des protéines impliquées dans la pathologie respiratoire caractéristique des infections grippales. La mesure de ces protéines est effectuée par des dosages utilisant des anticorps qui seuls peuvent reconnaître de manière très spécifique les protéines recherchées. Ces protéines virales existent sous formes isolées solubles ou sous forme fibrillaires. La quantification de ces protéines et la détermination de leur état moléculaire au cours d'infections permet de prédire la virulence de certaines souches virales et de mieux comprendre les mécanismes pathologiques mis-en-œuvre par ces virus. La synthèse d'anticorps est obtenue par injection d'un antigène ayant un pouvoir immunogène (c'est-à-dire capable d'être reconnu par le système immunitaire). C'est cette propriété que nous utilisons pour faire produire des anticorps chez le lapin. L'objectif plus spécifique de cette DAP est de produire des anticorps pour le projet plus global de caractérisation des facteurs de virulence du virus influenza A responsable de la grippe. Les antigènes protéiques sont administrés aux lapins selon une procédure incluant une première injection suivie d'une série de six injections de rappel afin d'augmenter la qualité des anticorps synthétisés par l'animal. Il n'existe pas à l'heure actuelle d'autres méthodes que l'inoculation d'antigènes *in vivo* pour produire des anticorps spécifiques. De ce fait il n'est pas possible de remplacer la production d'anticorps par des systèmes *in vitro*. Les antigènes utilisés dans ce projet sont des protéines recombinantes produites *in vitro* au sein de notre laboratoire. Ce projet, d'une durée de 5 ans prévoit la production d'immunsérums (sérum sanguin contenant des anticorps développés contre une substance qui a été inoculée) chez 54 lapins. Les immunsérums sont obtenus par prises de sang effectuées après chaque rappel au-delà du 3e rappel. Les volumes de prélèvement sont de 21 ml et sont espacés de 4 semaines, ce qui correspond à 15% du volume sanguin total d'un lapin et reste en dessous des limites des mécanismes compensatoires permettant une régénération des cellules sanguines sans contrainte

notable pour l'animal. Toutes les précautions sont prises pour minimiser les éventuelles souffrances engendrées par l'expérimentation surveillance quotidienne pour détecter des signes de souffrance ou d'altération de la santé des animaux; intervention du vétérinaire référent et préconisations éventuelles de soin ou de prise en charge de la douleur. Des points limites sont définis pour toutes les étapes pour lesquelles cela est nécessaire : ne mange pas, apathique, posture anormale (tordu, replié, prostré), diarrhée; l'expérimentation est arrêtée à chaque fois que ces points limites sont atteints. La mobilisation des animaux n'excède pas 6 mois. Trois animaux seront engagés pour l'immunisation d'un même antigène afin d'optimiser une production d'anticorps contre cet antigène. La qualité des anticorps obtenus est testée au laboratoire au fur et à mesure de la procédure d'immunisation dès le 3^e rappel. Ces mesures permettent d'évaluer si la procédure mérite ou non d'être poursuivie. Si certains antigènes ne s'avèrent pas immunogènes ou si les anticorps formés ne se montrent pas spécifiques, la procédure d'immunisation est arrêtée. Cela entraîne une réduction du nombre total d'animaux maintenus dans le protocole. En conséquence le nombre d'animaux effectivement engagés dans le protocole et la durée du protocole seront certainement inférieurs au total prévu dans le projet. Les animaux sont logés séparément, sans contrainte et selon les conditions en vigueur dans l'élevage. Néanmoins, les contacts sociaux obtenus par l'hébergement des différents animaux dans des cages adjacentes participent à l'enrichissement. Celui-ci est complété par l'apport d'objets (balles, chaînettes, mezzanines, jouets en polypropylène) dans l'environnement.

14629 Notre vie quotidienne est une chaîne complexe et discontinue de décisions et d'actions qui définissent nos comportements. Face à une situation de choix, chaque individu tendra à sélectionner la meilleure action possible parmi l'ensemble des alternatives possibles. Ce processus de « prise de décision » intervient sur la base d'une évaluation subjective propre à chaque individu des coûts et bénéfices de chaque action. Les cortex sensori-moteurs ont émergé comme de probables acteurs de ce processus. Cependant, de nombreuses structures sous-corticales agissent avec ces structures corticales afin d'encoder et de traiter tout changement dans la valeur subjective des conséquences des actions choisies. De façon intéressante, les cortex sensori-moteurs sont massivement innervés par des projections issues du noyau basolatéral de l'amygdale (BLA) Cette structure est par ailleurs essentielle aux tâches comportementales de prise de décision que nous nous proposons d'étudier.

Les mécanismes synaptiques et neuronaux restent cependant peu connus à ce jour. Notre projet tirera partie des méthodes *in vivo* les plus modernes (électrophysiologie et imagerie biphotonique chroniques, optogénétique) afin de mesurer l'activité neuronale et de manipuler de façon spécifique et réversible le cortex préfrontal, et donc de déterminer les relations causales entre le traitement de l'information dans le cortex préfrontal et les comportements de prise de décision.

L'étude des mécanismes de la prise de décision est un enjeu sociétal et économique majeur des neurosciences modernes, comme le relèvent de nombreuses situations humaines inadaptées (prise de risque, addiction au jeu, compulsivité).

Au total, 2100 souris seront utilisées dans notre projet. Pour le respect de la règle des 3R, (1) la solidité de nos hypothèses de travail (vérifiée par des expériences pilotes), la nature innovante des méthodes utilisées (imagerie biphotonique chronique), ainsi que la qualité de la mise en œuvre des procédures (basée sur une expertise reconnue de l'expérimentateur) permettra de réduire significativement le nombre des animaux. (2) Les chirurgies se feront sous anesthésie générale avec une couverture antalgique qui agira dès le réveil de l'animal et qui sera maintenue tant que l'animal montre des signes de souffrance. Les animaux seront surveillés quotidiennement avec une surveillance renforcée après chirurgie. Des points limites suffisamment précoces seront définis pour éviter des souffrances aux animaux avec la mise en place de mesures pour les soulager comme une réhydratation, le réchauffement, une nourriture adaptée, des traitements vétérinaires si nécessaire. (3) Les mécanismes de planification ne peuvent être étudiés que chez des animaux vigiles confrontés à une situation de choix. Dès lors, aucun des modèles *in vitro* ne peut être utilisé ici.

14630 Le tube digestif est un milieu complexe, source de nombreuses maladies, comme les maladies inflammatoires chroniques intestinales (maladie de Crohn et rectocolite hémorragique) et les infections bactériennes d'origine alimentaire (listeriose et salmonellose). De nouvelles approches sont en cours de développement pour viser des cibles thérapeutiques capables de réduire ces troubles intestinaux. Nos travaux visent l'étude des interactions entre le microbiote (microorganismes résidents du tractus digestif) et les cellules du système immunitaire de l'intestin, et leurs impacts sur la défense de l'organisme contre les infections bactériennes et le développement d'inflammation de la paroi du tube digestif.

Plus précisément, le projet présenté a pour objectif de comprendre les mécanismes d'interactions entre le système immunitaire et le microbiote en situation normale et en situation pathologique. Il se déroulera sur 5 ans et nécessitera un total maximum de 436 souris par an (soit 2184 souris au total). Afin de précisément définir les mécanismes physiopathologiques conduisant à l'inflammation et le rôle du microbiote dans ces maladies trois types de modèles d'inflammation ou d'infection intestinale seront utilisés. En parallèle dans ces différents modèles, le microbiote en lui-même pourra être modifié par différents moyens utilisation d'antibiotiques, ensemencement de bactéries dans le tube digestif de souris normales ou de souris élevées stérilement depuis la naissance (axéniques). L'essentiel des prélèvements (sang, tissus, contenus intestinaux) sera fait post mortem à l'exception des fèces.

Afin d'appliquer au mieux la règle des 3R, nous avons prévu dans nos projets scientifiques d'utiliser des expérimentations *in vitro* sur des lignées cellulaires préalablement à l'utilisation d'animaux, ce qui permet d'en réduire le nombre. Nos groupes de souris seront réduits à 6 animaux. Ce nombre d'animaux est calculé au plus juste en fonction de notre expérience antérieure pour garantir la qualité statistique des données. L'étude de ces écosystèmes impose le modèle animal pour valider les hypothèses soulevées grâce aux résultats des expérimentations *in vitro*. Il n'existe pas aujourd'hui de modèle *in vitro* récapitulant tous les paramètres du tube digestif. Les animaux sont hébergés dans une structure et des conditions parfaitement adaptées (litière changée régulièrement, eau et nourriture à volonté, température et hygrométrie régulées,). Nous avons veillé à enrichir le milieu de vie par l'ajout de feuilles de cellulose dans les cages et d'un abri prévu à cet effet. Le suivi attentif et régulier des animaux sera réalisé afin de minimiser autant que possible la souffrance éventuelle des animaux. Dans tous les cas, l'état de santé des animaux sera suivi quotidiennement afin d'évaluer au plus près l'évolution de l'inflammation induite par les protocoles expérimentaux et d'optimiser le bien-être des animaux. Des points limites ont été établis et mèneront à l'euthanasie des animaux si ceux-ci sont franchis. Ces animaux sociaux sont hébergés en groupe, jusqu'à 5 animaux par cages, et bénéficient d'un milieu enrichi par l'ajout de feuilles de cellulose dans les cages. Tous les animaux seront euthanasiés en fin d'expérimentation.

14631 Les sarcomes regroupent les tumeurs qui se développent dans les tissus de soutien de l'organisme, comme les tissus « mous » (les muscles par exemple) ou dans les os et le cartilage. Ils représentent 1% des cancers chez l'adulte mais 15% des cancers chez l'enfant.

Les rhabdomyosarcomes (RMS) sont les sarcomes des tissus mous les plus fréquents chez l'enfant et sont issus des muscles. Les thérapies actuelles sont lourdes et associent une élimination chirurgicale de la tumeur, un traitement de chimiothérapie et des séances de radiothérapie. Ces traitements intensifs ne sont pas sans conséquence en termes de séquelles à long terme pour les enfants. De plus, le taux de survie des enfants et adolescents atteints de RMS est de 75%, et chute à 20% si des métastases sont présentes. Il est donc nécessaire d'identifier les anomalies moléculaires associées à la transformation d'une cellule normale en une cellule tumorale pour améliorer la prise en charge de ces cancers.

Les RMS sont supposés dériver de cellules musculaires devenues tumorales. Les cellules musculaires sont enchâssées dans un échafaudage complexe de protéines, appelé matrice.

Ce projet de recherche vise précisément à définir le rôle d'une protéine de la matrice encore méconnue dans la survenue de RMS. Il a été établi que cette protéine semble jouer un rôle dans le fonctionnement normal du muscle et mis en évidence des anomalies dans son profil d'expression dans les RMS. Maintenant, le but est de chercher à définir si des anomalies de cette protéine

peuvent avoir un effet dans la survenue de RMS, en utilisant un modèle de souris transgénique créé au laboratoire n'exprimant pas ce gène. Cette protéine étant intégrée à la matrice, il est impossible de modéliser son rôle *in vitro*. L'objectif est de définir son rôle sur 1) l'apparition de RMS dans un contexte prédisposant induit par surexpression de l'oncogène KRASG12D (procédure 1) et 2) l'incidence et la croissance de tumeurs obtenues à partir de myoblastes transformés dans le muscle tibialis anterior (procédure 2).

Dans ce projet, nous utiliserons 90 souris (45 en procédure 1, et 45 en procédure 2). Ce nombre a été réduit au maximum pour permettre une analyse statistique des mesures de prise et de croissance tumorale entre les groupes. L'administration d'anesthésique et d'analgésique lors de la procédure de greffe, un suivi hebdomadaire des animaux inclus dans la procédure 1 et quotidien des animaux inclus dans la procédure 2 par deux expérimentateurs formés et la définition précise des points limites précoces et prédictifs d'un mal être seront mis en oeuvre afin de se conformer strictement à la règle des 3R. Les tumeurs seront prélevées post-mortem de manière à optimiser l'utilisation des animaux en analysant leurs caractéristiques moléculaires.

14632 L'évaluation des stocks dans le cadre du suivi des populations de poissons commerciaux est réalisée chaque année à partir en particulier des histogrammes en taille et en âge des populations de poissons. Ainsi, l'âge du poisson estimé à partir des pièces calcifiées est particulièrement important dans l'évaluation des stocks. Les pièces calcifiées et en particulier les otolithes présents dans l'oreille interne des poissons, grandissent par phénomène d'accrétion pendant toute la vie du poisson. L'observation des pièces calcifiées permet d'identifier les stries de croissance qui sont dues principalement à des paramètres environnementaux (température en particulier). L'objectif de cette étude est de mieux comprendre l'effet de l'évolution de la température (passage de 16°C à 21°C), dans un cadre de réchauffement climatique, sur les processus d'accrétion de l'otolithe à travers l'étude et le suivi de plusieurs de ses caractéristiques que sont sa croissance, son opacité et sa forme. Pour cela, des bars d'élevage qui viennent d'éclore (N=800) seront soumis à une température de 16°C et toutes les 4 semaines, plusieurs individus seront placés à 21°C jusqu'au terme de l'expérimentation. Ainsi, il sera possible de comparer l'impact de l'augmentation de la température entre les différentes conditions d'élevage (basées uniquement sur une différence de ratio temps à 16°C/temps à 21°C). Pour tester individuellement ces effets, il est nécessaire d'identifier individuellement le poisson (marquage tardif sous cutanée par puce électronique) et de marquer l'otolithe (marquage par injection intrapéritonéale d'oxytétracycline, antibiotique qui a des propriétés fluorescentes lorsqu'il est intégré dans les pièces calcifiées). Pour chaque individu, plusieurs marquages de l'otolithe seront réalisés (à partir de la 12ème semaine et avec une périodicité mensuelle) pour pouvoir suivre la forme (observable sous microscope à fluorescence) de l'otolithe des larves tout au long de l'expérience. L'élaboration et la mise en place des protocoles suivent la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner) :

- Remplacer Cette expérience est réalisée sur le bar qui est une espèce déjà très étudiée et dont le cycle d'élevage est maîtrisé en aquaculture depuis 40 ans. Bien que ce protocole puisse être réalisé sur d'autres espèces d'aquaculture, cette étude nécessite de travailler sur des individus vivants selon les protocoles d'élevage standardisés pour permettre de réaliser une expérimentation de 8 mois dans de bonnes conditions et d'observer l'évolution de la forme de l'otolithe au cours de la vie du poisson. De plus, le marquage de l'otolithe à l'oxytétracycline a déjà été testé avec succès sur cette espèce.

- Réduire Le nombre d'individus utilisés est optimisé afin de permettre de réaliser des tests statistiques appropriés aux différents objectifs du projet. Ainsi, il permet de tester 2 répliquas de 50 individus pour chaque condition et pour le témoin à différents moments de l'expérience selon des modèles mixtes à plusieurs facteurs.

- Raffiner Tout a été mis en place dans le cadre des procédures pour limiter la souffrance et le stress des animaux par des procédures d'anesthésie optimales. En dehors des phases opératoires, les poissons seront conservés dans des conditions d'élevage connues pour permettre à l'espèce d'exprimer ses performances optimales et un suivi journalier du bien-être animal sera réalisé selon

les indicateurs qualitatifs connus chez le poisson. Enfin, lors de toute manipulation, une anesthésie par balnéation dans un bain de Benzocaïne serait réalisée.

14633 Le bien-être animal est au cœur des préoccupations de notre société, qu'il s'agisse du grand public ou des autorités. Ces vingt dernières années, les recherches sur le bien-être animal se sont orientées sur l'étude des émotions, essentiellement sur les vertébrées et les insectes (seuls invertébrés étudiés). De nos jours les émotions des mollusques céphalopodes n'ont jamais été explorées. Ce projet vise donc à évaluer les émotions et la prise de décision chez deux espèces de seiche (*Sepia officinalis* et *Sepia pharaonis*) dans le but de 1) apporter de nouveaux outils pour estimer la souffrance psychologique et le niveau de bien-être des céphalopodes en captivité et donc d'acquérir des informations pour affiner la réglementation 2) apporter des connaissances générales de la fonction, du développement et de l'évolution des émotions 3) déterminer si un mollusque peut subjectivement ressentir (sentience) une situation ambiguë; et 4) évaluer les traits émotionnels et leur plasticité phénotypique au niveaux intra- et inter-spécifique. Dans le but de comprendre les racines évolutives des émotions et de la sentience des seiches différentes procédures seront utilisées pour atteindre trois objectifs. L'objectif 1 sera de déterminer les profils comportementaux des seiches en situation « confortable/positives » ou « inconfortable/négatives ». Les conditions proposées qui seront testées sont conformes à celles que les animaux rencontrent en conditions naturelles. Nous observerons leurs comportements couleurs, postures, activité, modalités de capture d'une proie au cours de la procédure 1, nous doserons différentes hormones au cours de la procédure 2 et déterminerons leurs performances cognitives (tests de choix) au cours de la procédure 3.

Le deuxième objectif sera de déterminer si certaines réponses émotionnelles peuvent être associées à une forme de conscience (sentience) chez les seiches : nous identifierons les émotions des animaux en situation de dilemme (avant, pendant, après un choix, procédure 4). Le troisième objectif sera de déterminer si l'environnement d'élevage influence les profils émotionnels en testant des animaux élevés des conditions plus ou moins enrichies/prévisibles pendant trois mois (procédure 5). Au cours de la réalisation de ce projet, toutes les dispositions seront mises en oeuvre pour le respect des 3R : 1) seule la procédure 2 est invasive (introduction d'une aiguille pour un prélèvement d'hémolymphe dans la veine céphalique après anesthésie), aucune n'entraîne a priori de souffrance ni de dommage durable. Les différentes conditions expérimentales choisies correspondent à des situations écologiques 2) les effectifs correspondent aux minima requis pour utiliser des méthodes statistiques appliquées aux distributions non-normales (en tenant compte d'éventuels aléas d'effectifs), les mêmes animaux, lorsque cela est possible participeront aux procédures non invasives (1, 3 et 4) 3) Il n'existe à l'heure actuelle pas de méthode, ni d'espèce pouvant se substituer aux seiches vivantes pour étudier leurs émotions.

Ces recherches s'inscrivent directement dans les travaux qui visent à améliorer les pratiques liées au maintien des seiches en stabulation. Les seiches, élevées au Centre de Recherches, proviendront d'oeufs prélevés sur une dizaine de pontes en Manche. Afin de minimiser les conséquences écologiques des prélèvements, les prélèvements n'excéderont pas 5% d'oeufs par ponte (chaque femelle pond jusqu'à 600 oeufs). Les juvéniles seront élevés dans une structure ayant reçu l'agrément de la DDPP. Le suivi quotidien de tous les animaux sera effectué par du personnel qualifié et expérimenté, en accord avec les règles éthiques et celles du respect du bien-être animal (Directive 2010/63/UE, arrêté 1/2/2013). Au terme des expériences le maximum d'individus sera relâché en mer (rehomeing) après expertise et autorisation de la DDTM (Direction Départementale des Territoires et de la Mer) et en accord avec les conditions décrites dans l'article 19 de la Directive 2010/63, sinon ils seront intégrés dans les cohortes de seiches élevées en routine au Centre de Recherches. Les individus qui atteindraient accidentellement un point limite en cours d'expérience seront euthanasiés selon les recommandations actuellement disponibles. Les tests seront effectués à partir de l'âge de 3 mois. Après un mois, les seiches seront élevées individuellement afin d'être en mesure de les suivre individuellement (il n'existe pas de technique de marquage individuel non invasif chez cette espèce) et pour éviter toute perturbation du comportement induites par des interactions entre elles. On peut noter à partir d'observations in situ

qu'à cette taille ces animaux semblent avoir un mode de vie solitaire en mer. Préalablement aux procédures, des seiches sub-adultes (20 maximum) élevées en routine au Centre de Recherche seront utilisées pour évaluer leur capacité pour la mise au point des expériences. En fonction des opportunités, certains individus sauvages (mâles ou femelles) collectés par casayage au printemps par le Centre de recherches à des fins de reproduction pourront être testés (10 maximum, procédures 1 à 3). Ce projet dans sa globalité utilisera un total maximal de 270 individus sur 5 ans (objectif 1 N=90, objectif 2 N=30 (+20 sub-adultes pour les observations préliminaires et 10 seiches sauvages pour ces 2 objectifs), objectif 3 N=120 (4 groupes de 30 individus)).

14634 Un anticorps est une molécule du système immunitaire reconnaissant des éléments de l'organisme comme du non-soi (antigènes). Produit naturellement par celui-ci, il est un élément essentiel pour répondre à une attaque contre l'organisme. Les scientifiques ont eu l'idée il y a plusieurs décennies de fabriquer de telles molécules en choisissant des cibles d'intérêt thérapeutique, notamment des cibles impliquées dans des cancers. L'utilisation d'anticorps thérapeutiques a révolutionné le traitement de nombreuses pathologies.

Dans le cadre d'une collaboration avec une spin-off, notre laboratoire participe au développement d'anticorps à visée thérapeutique dirigés contre des protéines membranaires appartenant à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs). Les RCPGs sont des cibles majeures de nombreux médicaments à base de petites molécules contre les cancers mais contre lesquelles il existe peu d'anticorps thérapeutiques.

L'explosion des anticorps thérapeutiques se fait dans les années 2000. On se rapproche progressivement des « balles magiques » dont avait rêvé Paul Ehrlich au début du XX^{ème} siècle, ces médicaments qui cibleraient spécifiquement les tissus malades sans affecter les tissus sains. En effet, l'un des modes d'action des anticorps est de se fixer sur des protéines membranaires fortement exprimées à la surface des cellules cancéreuses et de déclencher ainsi une cascade de réponses biologiques conduisant à la mort de ces cellules uniquement

Il est aussi envisageable de coupler à l'anticorps une toxine (ADC =Antibody-Drug Conjugates) afin de détruire les cellules cancéreuses de manière spécifique.

Le concept consiste à utiliser la spécificité d'un anticorps pour cibler la cellule tumorale et vectoriser un agent hautement toxique qui lui est associé. L'agent cytotoxique est chimiquement couplé à l'anticorps par l'intermédiaire d'un linker qui permettra, après internalisation ou bien à proximité des cellules tumorales, la libération d'une forme active à l'intérieur (ou à proximité) de la cellule ciblée. Selon leur nature et leur mécanisme d'action, plusieurs molécules d'une même drogue peuvent être conjuguées par anticorps.

Dans le cadre de cette collaboration, des anticorps ayant des potentialités thérapeutiques (haute affinité et haute spécificité pour la cible tumorale (conjugués ou pas avec des toxines) seront sélectionnés *in vitro*. Ils seront testés, ensuite, *in vivo* lors d'une étude préclinique de preuve de concept (POC). Le but d'une étude de preuve de concept est de faire la démonstration que le candidat médicament sélectionné présente une efficacité thérapeutique. Pour ce projet l'efficacité thérapeutique *in vivo* sera mise en évidence par une croissance tumorale atténuée et/ou une éradication de cette dernière. Les modèles tumoraux (humains et murins) utilisés seront des modèles de référence largement utilisés et reconnus dans le monde scientifique ou bien des modèles tumoraux validés par des équipes de recherches.

Aujourd'hui, Il n'existe aucune méthode alternative (modèle ex vivo ou computationnel) permettant de modéliser la complexité des mécanismes moléculaires, cellulaires, physiologiques, de biodistribution inhérent à ce projet. La souris est un modèle de choix pour sa proximité évolutive avec l'être humain et du fait qu'il permette de générer des modèles animaux tumoraux reproductibles.

Les cellules cancéreuses selon le modèle tumoral étudié; seront xénotreffées au souris en position hétérotopique (sous-cutanée) ou orthotopique (intracérébrale). Une fois la greffe cellulaire prise, les traitements seront administrés par la voie intrapéritonéale, par la voie intraveineuse ou par la voie intranasale en administration unique ou répétées à des temps prédéfinis.

L'efficacité antitumorale des candidats médicaments sera évaluée par le suivi de l'évolution tumorale.

Le nombre d'animaux utilisé pour ce projet sera au maximum de 7.200 souris en 5 ans.

Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet proviennent d'élevages agréés et sont nés et élevés en captivité. Leur nombre (1.440 rongeurs par an) a été réduit au minimum nécessaire tout en restant suffisant pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées et permettra de tester jusqu'à 12 anticorps par an sur 2 lignées tumorales.

Le bien-être des animaux est assuré, durant l'élevage, par le suivi quotidien des animaux par un personnel qualifié et compétent et la constitution de groupes sociaux d'animaux. Notamment, les animaux seront hébergés en groupe dans une cage enrichie avec des accessoires de jeu et du matériel pour la fabrication de nids. Si nécessaire, des critères d'arrêt d'expérimentation ont été réfléchis et seront appliqués afin d'empêcher toute souffrance animale.

14635 Nos travaux ont pour objectif d'évaluer les effets thérapeutiques potentiels de molécules régulatrices de l'activité protéolytique des metalloprotéases matricielles membranaires (membrane-type matrix metalloproteinases; MT-MMPs), dans le développement et la progression de la maladie d'Alzheimer (MA), contre laquelle, il n'existe aucun traitement efficace. Nous avons récemment découvert dans le modèle murin 5xFAD de la MA que deux membres de cette famille, MT1-MMP et MT5-MMP, sont des nouvelles cibles thérapeutiques potentielles. Nous souhaitons à présent administrer dans le cerveau des souris 5xFAD des molécules capables de moduler l'activité de MT1-MMP afin de mesurer leur impact sur différents marqueurs de la pathologie, comme l'accumulation du peptide bêta-amyloïde (A β) et d'autres métabolites de la protéine précurseur du peptide bêta-amyloïde (APP), ainsi que les niveaux de certains médiateurs inflammatoires et la réactivité gliale. Cette partie du projet devrait permettre d'établir une première preuve de concept sur une action thérapeutique *in vivo* des molécules candidates testées. Cette étude prendra en compte la règle des 3 R. Remplacement il n'existe à l'heure actuelle aucune méthode de substitution *in vitro* pour étudier les effets pharmacologiques des molécules candidates dans un contexte physiologique. Réduction le nombre d'animaux utilisé sera de 160 souris mâles, nombre établi selon le test statistique d'évaluation expérimentale BiostaTGV, études cliniques.

Raffinement les procédures utilisées seront réalisées sur des animaux anesthésiés et traités par des analgésiques. Une attention particulière sera portée aux animaux (observation et pesée) de façon à réduire autant que possible le stress et la souffrance au cours de l'expérience. Le microenvironnement sera enrichi par des nids végétaux en coton (Neslets). Enfin, nous utiliserons comme tests statistiques l'ANOVA suivie de test de comparaison entre groupes comme le test de Bonferroni ou le LSD Fischer.

14636 Pour s'attaquer plus efficacement aux maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), un des axes d'action est de ramener la composante du microbiote intestinal au centre de la prise en charge du patient. Il a en effet été démontré que le microbiote intestinal, qui se compose d'un assemblage de nombreuses espèces de bactéries, virus et levures est au centre du développement de ces maladies. Ainsi dans le cadre d'un partenariat industriel, notre équipe de recherche étudie l'utilisation d'une bactérie ou de composés issus de cette bactérie dans le traitement des MICI. Cette bactérie, *Faecalibacterium prausnitzii*, est largement retrouvée chez l'homme sain exempt de MICI (en moyenne 5% des bactéries naturellement résidentes dans le tractus digestif sont de cette espèce). Cette bactérie est cependant moins abondante chez les patients atteints de MICI. Cette espèce bactérienne est déjà largement décrite dans la littérature scientifique pour ses propriétés anti-inflammatoires, ce qui en fait une candidate de choix pour une approche thérapeutique basée sur un microorganisme.

Nous espérons grâce à ce projet pouvoir d'une part identifier une ou des formulations diminuant significativement l'inflammation et d'autre part recueillir des données expérimentales permettant d'envisager un essai clinique chez l'homme. Nous espérons ainsi pouvoir proposer aux patients un

complément aux traitements actuels l'objectif n'est pas de remplacer les traitements en vigueur mais de les compléter pour améliorer la qualité de vie des patients.

Notre démarche repose sur l'utilisation d'étapes successives limitant au maximum l'emploi d'animaux. Premièrement, un criblage *in vitro* essentiellement basé sur des modèles de cellules humaines ou de souris permettant d'obtenir des informations sur le potentiel anti-inflammatoire de la bactérie ou des composés qui en sont issus. Le ou les composés prometteurs sont ensuite sélectionnés pour des essais pré-cliniques impliquant des animaux (des souris) afin d'étudier l'efficacité et l'innocuité du composé. Une réaction inflammatoire est alors déclenchée chez les animaux à l'aide de produits chimiques afin de mimer une inflammation intestinale présente chez les patients atteints de MICI. Les composés sélectionnés sont alors administrés aux animaux et les effets bénéfiques sont mesurés. Différentes procédures d'inflammations chimiques d'intensités modérées seront utilisées dans le cadre de ce projet (les symptômes disparaissent normalement en quelques jours après l'administration de l'agent induisant une colite). Elles permettent de reproduire des symptômes comparables à ceux de la maladie de Crohn ou de la rectocolite hémorragique, qui appartiennent au groupe des MICI. Les protocoles utilisés seront soit de type chronique (mimant l'alternance de crises et de périodes de rémission) soit de type ponctuel (un seul épisode inflammatoire). Au cours de l'inflammation, les animaux développent des symptômes comparables à ceux des patients (diarrhées, lésions des tissus intestinaux, douleurs abdominales, réaction immunitaire altérée). Pendant les phases inflammatoires qui durent quelques jours, nous ne pouvons pas utiliser d'anti-douleurs car les résultats attendus pourraient être faussés. Cependant, pour certaines administrations de produits ou prélèvements ponctuels, des anesthésies générales de courtes durées seront réalisées pour le bien-être des animaux, sans que cela porte atteinte à la qualité des résultats.

Le modèle souris que nous utilisons est suffisamment comparable à l'homme dans l'optique de passer à un essai clinique et d'évaluer l'efficacité du produit bactérien en interaction avec l'hôte et le microbiote déjà présent. Nous avons ainsi accès aux différentes composantes de la réponse à l'inflammation réponse des tissus, réponse du système immunitaire, réponse du microbiote, etc. Autant d'éléments qui ne sont pour l'instant pas accessibles avec des modèles *in vitro*.

Dans ce projet d'une durée de 5 ans, qui inclut uniquement des souris, nous utiliserons 4140 animaux au maximum. Afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés, sur la base de notre expérience et de la littérature conséquente déjà disponible, nous avons déterminé le nombre d'animaux nécessaire et suffisant à l'obtention de résultats statistiquement exploitables. Nous réduisons également au maximum le nombre de répétitions d'essais.

Dans tous les cas, l'état de santé des animaux sera suivi quotidiennement afin d'évaluer au plus près l'évolution de l'inflammation induite par les protocoles expérimentaux et d'optimiser le bien-être des animaux. Des critères d'arrêt ont été établis une perte de poids importante ou un ralentissement prononcé de l'activité locomotrice. Bien que rarement atteints dans nos essais, ils mènent à l'euthanasie des animaux si ceux-ci sont franchis afin d'éviter des souffrances inutiles et injustifiées. Pour minimiser leur stress éventuel, ces animaux sociaux sont logiquement hébergés en groupe, jusqu'à 10 animaux par cage, et bénéficient d'un milieu enrichi par l'ajout de feuilles de cellulose dans les cages.

14637 L'infection osseuse ou ostéite est fréquente chez le diabétique et présente dans 30 à 80 % des cas selon la gravité de la maladie. Environ 36% des patients qui présentent une ostéite subissent une amputation et 68% des patients ayant subi une première amputation subiront une seconde amputation dans les 5 ans. Cette infection est par ailleurs suivie d'une mortalité importante.

Parmi les espèces bactériennes responsables de ces ostéites figurent les espèces du genre *Staphylococcus* sp (51%) avec un rôle important des Staphylocoques à coagulase négative.

La durée optimale du traitement antibiotique des ostéites du pied diabétique reste difficile à préciser en raison du nombre limité d'études cliniques (notamment sur les ostéites à Staphylocoque à coagulase négative) ainsi que du peu de modèles expérimentaux disponibles dans la littérature.

L'objectif de l'étude est de mettre au point un modèle d'ostéite à *Staphylococcus epidermidis* chez le rat (en l'absence de matériel étranger et/ou d'agent adjuvant) puis d'évaluer l'efficacité relative de différentes stratégies thérapeutiques et de différentes durées de traitement dans ce modèle.

L'étude nécessitera plusieurs sous-études

- 25 rats pour la mise au point pharmacologique des 5 antibiotiques administrés;
- 30 rats pour la mise au point du modèle;
- 141 rats pour la phase d'évaluation de l'efficacité des traitements; Par conséquent, un effectif de 196 rats mâles Wistar sera nécessaire pour cette étude.

Dans le respect de la règle des 3 « R », les études précédentes nous ont permis de réduire au maximum le nombre d'animaux pour ce projet en utilisant 3 rats par groupe afin d'obtenir des analyses statistiques fiables. En effet, les résultats d'études précédentes dans un modèle comparable nous indiquent qu'un effectif de 3 rats (2 tibias infectés par rat) par groupe est requis (excepté dans les phases de mise au point). De même, ces expériences passées nous ont permis de raffiner considérablement la procédure (prise en charge de la douleur chez l'animal avec administration post-chirurgicale d'antalgiques, mise à disposition de croquettes directement dans la cage, amélioration de la technique chirurgicale elle-même, suivi bi-quotidien des animaux ...). Le remplacement du modèle animal n'est pas possible puisqu'il s'agit d'une infection complexe, impossible à reproduire *in vitro*.

14638 Le vieillissement de la population ainsi qu'un grand nombre de pathologies, comme l'obésité et les cancers, sont accompagnés d'une altération de la masse musculaire et de la masse osseuse. Celle-ci est associée à une dégradation de la qualité de vie et du pronostic clinique des patients. Actuellement, il n'existe aucun traitement efficace contre la sarcopénie et l'ostéopénie, d'où le besoin urgent de développer des stratégies thérapeutiques. Les molécules ayant la capacité d'agir à la fois sur les muscles et sur les os sont des candidats extrêmement intéressants. L'utilisation d'animaux est nécessaire dans le cadre de telles recherches répondant à des problématiques physiologiques très globales. En effet, le système os/muscles est un système dynamique complexe basé sur des communications entre les muscles et les os. Le modèle animal est le seul qui permet de maintenir l'intégrité et la complexité du système (innervation des muscles, facteurs hormonaux). Récemment, il a été montré qu'un facteur de croissance intestinal, le FGF19 (fibroblast growth factor 19) avait la capacité d'augmenter la masse musculaire chez les souris saines mais aussi chez les souris présentant un défaut de masse musculaire. De plus, des études préliminaires menées chez la souris et chez le rat ont permis de mettre en évidence qu'il était aussi capable de stimuler la croissance osseuse. Le FGF19 apparaît donc comme un candidat thérapeutique très prometteur. L'objectif original de cette étude est de comprendre comment le FGF19 agit sur le système osseux et d'évaluer son potentiel thérapeutique en tant qu'agent protecteur des masses musculaire et osseuse.

Pour répondre à cet objectif, des souris mâles et des souris femelles de trois tranches d'âge différentes seront utilisées des souris jeunes dont la croissance musculaire et osseuse est en plein essor, des souris adultes qui ont achevé leur croissance et enfin des souris âgées dont les masses musculaire et osseuse déclinent naturellement à cause du vieillissement. Ces souris seront soumises à un traitement par injections de FGF19 ou de placebo. Les répercussions de ce traitement sur la masse musculaire, la force musculaire et la masse osseuse seront étudiées.

En accord avec la règle des 3R, les souris seront surveillées tous les jours afin d'identifier et de limiter tout risque de souffrance ou de mal-être.

Un nombre total maximal de 360 souris sera utilisé. Cet effectif est nécessaire pour réaliser l'ensemble des analyses biologiques, satisfaire les études statistiques et tirer des conclusions permettant de répondre à la question scientifique posée.

14639 La compréhension du comportement du Silure fait suite à une première étude bilan de 30 ans de suivi de l'installation de cette espèce. A l'heure où son classement vis à vis de l'article R432-5, relatif

à la liste des espèces de poissons, de crustacés et de grenouilles susceptibles de provoquer des déséquilibres biologiques est remis en cause un tel suivi apparait de première importance.

En effet, malgré une installation "ancienne", les mœurs de ce poisson restent méconnus. L'idée de notre projet est donc de mieux connaître le comportement et les déplacements du Silure et notamment les zones de reproduction et de regroupements cycliques.

Du fait de la difficulté d'appréhender des individus isolés dans de grands milieux (avec des profondeurs supérieures à 5 m et des largeurs de cours d'eau dépassant les 100 m), où la capture par pêche électrique est relativement inefficace, l'objectif de l'étude présentée ici est

(1) de capturer et marquer 27 silures adultes (via l'implantation chirurgicale d'une marque émettrice de 12 g à 24 g selon la masse de l'individu à marquer)

(2) de relâcher les individus marqués sur leur lieu de capture et d'enregistrer leurs déplacements sur une période maximale de 4 ans (durée de vie des émetteurs), au moyen d'écouteurs embarqués.

Nous avons veillé au respect de la règle dite des " 3R "

- "R" de "Remplacement" : La question écologique posée est d'étudier le comportement individuel des silures dans le Rhône. De ce fait, il n'est pas envisageable de réaliser cette expérimentation sur d'autres individus, ni de réaliser ces expérimentations en conditions contrôlées (fluvarium par exemple). L'absence de connaissances quantitatives sur les zones de reproduction annule également toute possibilité de modélisation.

- "R" de "Réduire" : La taille de l'échantillon, limitée à 27 individus, vise à satisfaire aux besoins minima de traçabilité des individus. Enfin, la taille des individus choisis, supérieure à 1,30m a été fixée pour favoriser la cicatrisation post opératoire et limiter les risques de prédation ou cannibalisme.

- "R" de "Raffiner" : Toutes les manipulations se feront sous anesthésie locale (adaptée à la procédure de marquage). Les protocoles sont développés pour limiter la durée de l'opération dans le temps. Enfin, la taille des individus choisis, supérieure à 1,30m a également pour intérêt d'avoir un très faible ratio poids de la marque / poids de l'individu.

14640 La β -thalassémie et la drépanocytose sont de graves anémies diagnostiquées chez près de 340 000 personnes chaque année dans le monde. La β -thalassémie se caractérise par une réduction ou une absence de l'expression de l'hémoglobine. La drépanocytose est provoquée par une mutation qui altère la structure de cette molécule. Ces deux maladies se caractérisent par des crises anémiques et une altération grave des organes vitaux. Les traitements curatifs actuels ne sont accessibles que pour une fraction des patients ou présentent des résultats insatisfaisants pour la communauté médicale. Des stratégies thérapeutiques ont été préalablement développées *in vitro* sur des modèles cellulaires proches des cellules souches de patients, ou directement sur ce type de cellules thérapeutiques. Cela a permis d'améliorer ces protocoles tout en remplaçant l'utilisation immédiate de modèles animaux.

Ces stratégies thérapeutiques se basent sur 2 principes

- Intégration d'un gène exprimant une hémoglobine fonctionnelle couplée à un système d'inhibition de l'hémoglobine drépanocytaire (pour les patients drépanocytaires).

- Réactivation de l'hémoglobine fœtale (pour les patients drépanocytaires et β -thalassémiques). L'induction de cette hémoglobine permettrait de pallier l'absence d'hémoglobine chez les patients β -thalassémiques ou à compenser l'expression de l'hémoglobine drépanocytaire chez les patients drépanocytaires.

Notre projet vise à tester sur un modèle murin les différentes stratégies thérapeutiques développées *in vitro* au cours de ces quatre dernières années. Le recours à un modèle murin humanisé permettant la greffe de cellules souches humaines est désormais nécessaire afin de valider définitivement ces protocoles thérapeutiques. Pour ce faire, les souris subiront dans un premier temps un traitement chimiothérapeutique afin de détruire leur compartiment hématopoïétique. Nous procéderons ensuite à une greffe, sous anesthésie générale, de cellules souches humaines ayant subi nos protocoles thérapeutiques, afin de reconstituer un compartiment hématopoïétique humain.

Le suivi de la prise de greffe sera réalisé par des prélèvements de sang en zone stérile et sous anesthésie générale afin de limiter le stress et la souffrance des animaux.

Pour une partie des animaux génétiquement modifiés utilisés, une procédure d'induction de la production de globules rouges humains dans la circulation sera réalisée avant leur mise à mort. Cette procédure permettra de mesurer l'efficacité de ces traitements thérapeutiques directement sur les globules rouges issus des cellules de patients traités.

Ce projet est développé dans le respect de la règle des 3R, un nombre minimal d'animaux sera donc utilisé afin d'atteindre les objectifs. Ainsi, 765 souris seront utilisées sur une période de 5 ans. Il s'agit du nombre d'animaux jugé nécessaire pour obtenir des résultats analysables, en incluant les répétitions indispensables à la démonstration. Afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, les procédures douloureuses seront réalisées sous anesthésie générale avec une surveillance régulière. Les antalgiques seront administrés systématiquement en post-opératoire et pourront être re-administrés en cas de nécessité. Enfin, des points limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire. Un dispositif de nidification et de maisonnettes en carton sera également mis à disposition dans les cages afin d'améliorer le bien-être des souris.

A terme, notre projet permettra d'apporter aux patients drépanocytaires et β -thalassémiques un traitement curatif permettant de supprimer définitivement leurs symptômes tout en réduisant significativement le coût total de la prise en charge de leur maladie tout au long de leur vie.

14641 Les acides nucléiques de forme et de taille différentes constituent une nouvelle classe d'agents thérapeutiques prometteurs. Pour que ces acides nucléiques puissent avoir une activité thérapeutique *in vivo*, il est nécessaire de rechercher des moyens efficaces de délivrance dans les tissus et cellules cibles du médicament. Au sein de notre groupe thématique, la recherche est axée sur l'optimisation de différents systèmes de transfert d'acides nucléiques *in vivo*. Ces systèmes de vectorisation des acides nucléiques sont chimiques et/ou physiques. Nous développons 2 types de vecteurs chimiques (1) des microbulles lipidiques sensibles aux ultrasons (2) des lipopolyplexes sous forme de liposomes et de polymères cationiques biocompatibles. La toxicité et l'efficacité des différentes formulations ont été évaluées *in vitro* sur des cellules en culture. Ce travail en amont a permis de limiter le nombre d'essais chez l'animal. La forte efficacité de nos systèmes de transfert nous conduit maintenant à démontrer leur efficacité *in vivo* ce qui ne peut être fait que chez l'animal. L'établissement demandeur où auront lieu les expérimentations a pour objectif d'évaluer la meilleure combinaison entre différents acides nucléiques thérapeutiques, d'utiliser des microbulles activées par ultrasons ou des vecteurs chimiques pour délivrer l'actif (acide nucléique) dans les organes cibles et des tumeurs solides orthotopiques ou xenogreffées afin d'optimiser l'activité thérapeutique du médicament. Le mode de délivrance sera aussi un paramètre à prendre en compte selon le modèle biologique et la situation de la thématique (injection systémique ou locale). Notamment, une étude pas à pas permettra de sélectionner des paramètres d'activité de nos actifs. Cette méthodologie (injection locale/systémique) permettra de diminuer le nombre d'animaux. L'injection locale est considérée comme une étude préalable à l'injection systémique qui est la méthode permettant un transfert technologique chez l'homme. L'échographie haute résolution sera utilisée pour déterminer de façon non invasive la taille des tumeurs traitées ou pour attester de la bonne injection des microbulles et vérifier si elles sont toujours présentes après sonoporation. Le suivi de l'efficacité de transfection sera effectué soit sur site soit sur le site d'un établissement partenaire par imagerie optique non invasive (imagerie de bioluminescence ou de fluorescence). Notre étude chez l'animal permettra à courts termes de mettre au point une méthode fonctionnelle non invasive, non douloureuse de transfert d'acides nucléiques, y compris dans les tissus profonds. A long terme, ce sont des applications cliniques qui sont visées avec notamment le traitement de différentes maladies comme le cancer, les pathologies dégénératives des tendons, des muscles, du foie ou du cerveau. L'objectif du projet est donc de tester l'efficacité de nos acides nucléiques à différentes doses en utilisant nos différents systèmes de transfert d'acides nucléiques.

Le projet se déroule en plusieurs étapes

- L'implantation de cellules tumorales pour les différents modèles tumoraux du laboratoire. Durant cette étape les modèles tumoraux seront mis en place : les modèles 4T1 et MDA-MB231 (intra mammaire) pour les tumeurs mammaires, le modèle EG7 (sous cutané) pour le lymphome et le modèle A549 (sous cutané) pour la tumeur du poumon.

- Injection intratumorale des actifs vectorisés. Durant cette étape les actifs de type (2) seront testés afin de sélectionner les meilleures formulations pour la suite.

- Injection systémique et sonoporation guidée par échographie sur le tissu cible. Durant cette étape les actifs de type (1) injectés par voie intraveineuse seront activés par ultrasons et testés dans différents tissus sains (cerveau, muscle, tendon, foie) et tumoraux (4T1 et EG7); les actifs de type (2) seront testés par injection systémique.

Dans le cadre du tissu tumoral, les procédures impliquant l'implantation d'une tumeur le délai entre l'implantation tumorale et le traitement sera compris entre J6 et J10 en fonction de la tumeur.

Pour les tissus sains testés (cerveau, muscle, tendon, foie) dans la procédure 2 le traitement aura lieu sans contrainte de temps.

Au total nous prévoyons d'utiliser 2968 souris. Ce nombre d'animaux permet de couvrir l'ensemble de nos projets de transfert de gène sur 5 ans. Ces animaux sont répartis 3 phases du projet avec plusieurs modèles de tumeurs justifiant le nombre élevé de souris nécessaires au projet. Ce projet s'appuie sur des publications dans le domaine du transfert d'acides nucléiques et du cancer depuis plus de dix ans et concerne l'activité de plusieurs chercheurs de notre équipe travaillant sur la thématique commune des acides nucléiques comme médicament innovant. La nécrose possible de la tumeur solide sera considérée comme un dommage possible ainsi que d'autres critères connus pour un animal porteur de tumeur. Des points limites adaptés sont mis en place. Un protocole analgésique est prévu en cas d'apparition de douleurs avant le point limite.

Concernant le transfert de gène dans le cerveau et d'autres organes. Ce projet sera mené conformément à la règle des 3R l'ensemble des procédures seront réalisées sur animaux anesthésiés (raffiner). Le nombre d'animaux sera réduit si les résultats escomptés sont obtenus avant la réalisation de l'ensemble des procédures. De plus l'imagerie échographique non invasive permet de suivre l'efficacité d'un traitement sur le même animal (réduire). Le développement de modèles animaux reste nécessaire car il n'existe pas aujourd'hui de modèles représentatifs de la complexité d'un organisme entier sain ou pathologique (remplacer).

14642 La chirurgie vitréo-rétinienne comprend diverses interventions touchant à la rétine et à la cavité vitréenne de l'œil chirurgie du décollement de la rétine, de la macula (membrane épi rétinienne maculaire, trou maculaire, ...), des complications de la cataracte, de la rétinopathie diabétique, des thromboses veineuses, et autres atteintes vasculaires rétiniennes, des traumatismes oculaires, et de l'infection intraoculaire (endophtalmie). Dans tous les cas, ce sont des pathologies sévères de la rétine pouvant compromettre la vision. Le succès de ces microchirurgies complexes et à des échelles de précision de l'ordre de 20 micromètres repose essentiellement sur la maîtrise du geste par le chirurgien. Une erreur peut entraîner des lésions tissulaires définitives.

Les robots chirurgicaux sont développés depuis les années 80. En 1998, un premier pontage coronarien a été effectué par le robot d'assistance chirurgicale Da Vinci. Aujourd'hui les innovations sont faites sur l'automatisation de diverses chirurgies par des robots spécialisés qui permettront des interventions complexes dans zones difficiles d'accès du corps humain.

Les robots chirurgicaux ont des avantages non négligeables. Tous d'abord, du point de vue du chirurgien, cela leur confèrera une dextérité, une visibilité, une précision, une reproductibilité et une liberté de mouvements plus satisfaisants. Enfin du point de vue du patient, il a pour intérêt de réduire la durée d'hospitalisation, les douleurs postopératoires, les risques d'infection et le temps de rétablissement/retour à une activité normale.

Le but de cette nouvelle étude est de valider un bras robotisé chirurgical innovant pour la chirurgie rétino-vitréenne qui a été développé par les chirurgiens de notre laboratoire.

Après avoir testé le bras robotisé sur des globes oculaires isolés (animaux des abattoirs) l'étape sur animaux vivants est indispensable avant de pouvoir passer aux "first in man".

Le modèle lapin est idéal, car la taille de son œil est très proche de celle de l'homme. Cependant, la taille de son cristallin est proportionnellement plus importante que chez l'homme et il sera indispensable de l'extraire 1 semaine avant la chirurgie rétinienne.

Au total 6 lapins seront utiles pour ce projet. Ce nombre est réduit au MINIMUM pour effectuer toutes les interventions chirurgicales que permet le robot. Ce nombre doit OBLIGATOIREMENT ÊTRE MIS EN ŒUVRE *IN VIVO* afin de pouvoir utiliser une première fois le robot chez l'Humain.

Tout est mis en œuvre pour LIMITER AU MAXIMUM LE STRESS ET LA DOULEUR DE L'ANIMAL (anesthésie générale pendant les chirurgies). Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité, par du personnel qualifié, pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. La douleur est rigoureusement contrôlée grâce à des points limites évalués en amont, et gérée grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (myorelaxant/anesthésie/analgésie). Par ailleurs, les lapins sont hébergés en cage réglementaire (plateforme et paroi transparente entre 2 cages); dans un environnement enrichi (jouet kong et autres jeux). Enfin, l'eau et la nourriture (granules et foin) sont mises à disposition "ad libitum" et de la musique est diffusée en salle d'hébergement pour diminuer le stress et atténuer les bruits environnementaux.

14643 1-Objectif

La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative caractérisée par la perte sélective et progressive d'un certain type de neurones, les neurones dopaminergiques de la substance noire, se traduisant par l'apparition de troubles moteurs invalidants. Deuxième maladie neurodégénérative après la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson est la première cause de handicap chez les personnes âgées. A ce jour, l'étiologie de la maladie n'est pas connue et aucun traitement ne permet de freiner la progression de la maladie.

Le projet s'inscrit dans la recherche d'un traitement contre la maladie de Parkinson et vise à valider le potentiel thérapeutique d'une molécule, la nétrine-1, dans un modèle animal (rat) de la maladie qui consiste à reproduire la perte des neurones dopaminergiques de la substance noire.

Des travaux préliminaires dans ce modèle animal ont permis de mettre en évidence un effet protecteur de l'injection intracérébrale de nétrine-1 sur les neurones dopaminergiques de la substance noire. Pour progresser vers la clinique, il s'agit à présent de tester l'effet de molécules mimant la nétrine-1.

2- Retombées attendues

Compte-tenu du vieillissement général de la population, traiter la maladie de Parkinson constitue un enjeu socio-économique et de santé publique majeure. Le projet a pour but d'aboutir à un outil thérapeutique modulateur de la maladie de Parkinson qui permettrait de ralentir, arrêter voire inverser le cours de la pathologie. Cette étude permettra également d'apporter un nouvel éclairage sur la fonction biologique de la nétrine-1 dans le cerveau adulte, en particulier dans le maintien, la fonction ou la survie des neurones dopaminergiques

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

-Remplacement Ce projet fait suite à des travaux antérieurs menés *in vitro*, sur des cellules nerveuses en culture, et *in vivo* sur le modèle de rat intoxiqué à la 6-OHDA, un modèle animal de référence de la maladie de Parkinson. Ces travaux ont démontré l'efficacité neuro-protectrice de la nétrine-1. Pour mieux confirmer le potentiel thérapeutique de la nétrine-1 pour le traitement de la maladie, le projet propose des expériences supplémentaires sur ce même modèle parkinsonien.

-Réduction Les procédures décrites dans ce projet comprennent des actes chirurgicaux (stéréotaxie) ainsi que des tests de comportement moteur.

En prenant en compte le taux d'échec des procédures (de 10 à 25%) et la variabilité interindividuelle dans le comportement moteur des rats, un maximum de 15 animaux par groupe est nécessaire pour obtenir des résultats exploitables et interprétables statistiquement.

-Raffinement Les procédures comprennent des temps spécifiques consacrés à l'acclimatation, l'appropriation et à l'habituation aux manipulations, de l'animal. Le bien-être et la gestion de la douleur de l'animal sont pris en compte tout au long des procédures à travers la mise en place d'un calendrier et grille de suivi de l'animal, d'un protocole de soins pré-, per- et postopératoires adaptés et la définition de points limites. Le projet bénéficie du fait que le modèle animal et les protocoles expérimentaux choisis sont utilisés en routine au laboratoire et bien référencés dans la littérature scientifique.

- Nombre total d'animaux inclus dans ce projet

Au total, ce projet nécessitera l'utilisation au maximum de 352 rats.

14644 Les virus transmis par les insectes (arthropod-borne virus, arbovirus) et en particulier ceux transmis par les moustiques, tels que le virus de la Dengue, Chikungunya et Zika, représentent un problème majeur de santé publique. En effet, on estime à plus de 390 millions le nombre de nouvelles infections par le virus de la Dengue chaque année et près de 40% de la population mondiale est considérée « à risque ». A ce jour, il n'existe aucun vaccin, ni aucun traitement efficace contre ces maladies. Les principales mesures de santé publiques mises en place reposent sur le contrôle de la population des insectes vecteurs, cependant l'impact réel de ces procédures sur la transmission des virus n'a pas encore été déterminée. De nouveaux virus transmissibles par les moustiques émergent chaque année, il devient urgent d'étudier et de comprendre les bases moléculaires de la transmission de ces virus afin de pouvoir la contrôler.

Dans cette optique, nous cherchons à comprendre les mécanismes mis en place chez ces insectes lors de l'infection virale, qui permettent leur résistance. Une meilleure connaissance du fonctionnement de l'immunité des moustiques permettrait d'envisager l'utilisation de méthodes basées sur le renforcement de la résistance des populations naturelles de ces derniers, afin de réduire la propagation de ce type de maladies.

Le cycle de transmission de ces arbovirus débute par l'infection du moustique au cours d'un repas sanguin sur un hôte infecté. Afin de mieux comprendre les interactions vecteur-virus au cours de la transmission de ce dernier, il est important de s'approcher au plus des conditions naturelles d'infection. Ainsi, l'infection du moustique se passe par voie orale, lors d'un repas sanguin sur une souris. De plus, les femelles moustiques étant hématophages obligatoires, elles nécessitent des repas sanguins réguliers afin de pouvoir pondre des œufs et maintenir les colonies. De ce fait, les souris sont également utilisées à cette fin.

Les protocoles que nous mettrons en place ont été établis en conformité avec les exigences de remplacement, réduction et de raffinement

- l'utilisation des souris ne peut être remplacée par la technique de repas sanguin sur membrane artificielle avec du sang humain ou animal, du fait de la meilleure efficacité du repas sanguin sur animal vivant (deux fois plus efficace que sur membrane), qui permet donc un meilleur maintien des lignées ainsi qu'une diminution du risque de perte de ces dernières

- afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés, chaque souris sera utilisée pour plusieurs repas sanguins non infectieux avec une période de récupération de 4 semaines entre chaque repas des moustiques, afin qu'elle puisse reconstituer son stock de cellules sanguines. Nous adapterons également le nombre de repas par lignée selon leur utilisation.

- les souris seront élevées en groupes sociaux de 3 à 6 individus, au sein d'un milieu enrichi (palets de papiers et balles de cotons qu'elles utilisent pour construire leur nid). Les repas sanguins se feront sous anesthésie et le nombre de moustiques se nourrissant sur une souris sera strictement contrôlé (200 femelles maximum) afin de limiter le prélèvement sanguin. Aucune réaction inflammatoire au niveau des piqûres n'a été observée à ce jour, et les souris ne présentent pas de signes de dommages lors du réveil. Toute souris infectée sera mise à mort à un stade asymptomatique de l'infection virale.

Il sera nécessaire d'utiliser environ 55 souris par an pour maintenir 50 (30-70) lignées différentes de moustiques et 286 souris pour les infections, ce qui représente un total d'environ 341 souris par année, soit 1705 souris pour la durée totale du projet.

14645 La production de cellules sanguines, mécanisme appelé hématopoïèse, s'établit à partir des cellules souches hématopoïétiques (CSH). Ces cellules, très rares dans la moelle osseuse, ont la capacité de s'auto-renouveler et de se différencier vers tous les types cellulaires sanguins. Les maladies hématologiques malignes (par exemple leucémies, néoplasmes myéloprolifératifs) prennent leur origine dans les dérèglements des CSH qui conduisent à la « dominance clonale » d'une CSH maligne sur les CSH normales.

Les études chez la souris ont apporté de nombreuses connaissances sur l'hématopoïèse normale et maligne. Ces études sont très souvent basées sur des greffes de cellules médullaires chez des animaux receveurs dont l'hématopoïèse a préalablement été supprimée par une irradiation du corps entier. Elles permettent de suivre le développement de CSH greffées dans l'organisme receveur car la CSH normale ou maligne s'implante peu sans irradiation. Cependant, l'irradiation corps entier induit un biais à la généralisation des résultats, les données récentes montrant que l'hématopoïèse est variable entre un receveur irradié ou non. Nous avons donc décidé de développer une technique permettant l'étude du développement d'une maladie hématologique maligne dans un organisme à partir d'un modèle le moins irradié possible pour s'approcher au plus près de ce qui survient chez l'Homme au début d'une telle pathologie. Les projets portant sur l'étude physiologique des facteurs moléculaires et cellulaires influençant l'initiation et l'évolution d'une maladie hématopoïétique dans un organisme, il n'est pas possible d'obtenir les réponses en utilisant un modèle cellulaire.

La technique envisagée consiste à irradier localement le membre postérieur d'une souris pour créer un foyer à partir duquel les cellules médullaires greffées se propageront dans les organes non irradiés du receveur. L'utilisation de ce protocole avec des cellules normales montre, 3 mois après la greffe, des cellules donneuses en grand nombre dans les os de la patte irradiée et en faible nombre dans les organes non irradiés. Ce résultat montre que l'irradiation locale permet l'implantation durable d'un greffon chez la souris et son développement dans l'organisme non irradié.

Nous projetons d'appliquer cette technique à l'étude des néoplasmes myéloprolifératifs (NMP). Les NMP sont des maladies caractérisées par la prolifération dérégulée de CSH aboutissant à la production excessive de cellules sanguines. Elles sont causées par des mutations dont la plus fréquente (60% des cas) est JAK2V617F. Les souris exprimant cette mutation dans la CSH développent une pathologie semblable aux NMP de l'Homme suggérant que cette mutation est suffisante à induire la maladie. Cependant JAK2V617F est retrouvée chez des personnes saines suggérant que d'autres facteurs génétiques et/ou environnementaux concourent au développement de la maladie.

Pour montrer que la maladie peut se développer dans une souris localement irradiée, nous comparerons la greffe de cellules normales et JAK2V617F après une irradiation localisée. Nous utiliserons ce système pour analyser les modifications de l'environnement cellulaire et hormonal accompagnant le développement de la maladie dans la patte irradiée et dans la patte non irradiée. Nous déterminerons ensuite la cinétique de cette maladie et le rôle de la rate dans le développement de la maladie dans l'organisme. A plus long terme, une autre mutation et des facteurs de stress et de prédisposition ainsi que 3 inhibiteurs de voies de signalisation des médicaments seront testés pour étudier leur implication.

Dans un deuxième temps, nous envisageons d'étudier les troubles hématopoïétiques liés à l'irradiation à faible dose prise par les tissus sains lors d'une radiothérapie. En effet, les études statistiques ont montré une association entre l'exposition prolongée au rayonnement à faible dose et l'apparition de leucémies. En tenant compte de la littérature et de l'opportunité de calculer la dose intégrale prise par les tissus sains, nous envisageons d'étudier les troubles hématopoïétiques après une exposition à long terme à une irradiation faible dose chez la souris afin de mimer l'irradiation prise par les tissus sains pendant une radiothérapie chez l'homme.

Pour cette étude, nous avons retenu plusieurs modèles de rongeurs, élevés dans un établissement agréé. Le nombre d'animaux (2150) a été déterminé grâce aux expériences pilotes réalisées dans le cadre d'un précédent projet. Il correspond au minimum nécessaire pour assurer la validité statistique des expériences qui seront menées.

L'état de santé des animaux sera étroitement surveillé tout au long des expériences et évalué cliniquement afin de limiter leurs contraintes. L'application de critères d'arrêts des animaux hébergés en groupe nous permettra d'intervenir immédiatement dès le moindre signe de souffrance en utilisant des traitements antalgiques appropriés ou de décider d'une euthanasie.

14646 Le Silure glane (*Silurus glanis*), plus grand poisson d'eau douce européen originaire d'Europe de l'Est, a récemment fait son apparition dans un lac Français qui fait l'objet de cette étude. Sa colonisation dans ce milieu ne cesse d'évoluer, soulevant ainsi bon nombre d'inquiétudes et de questionnements quant à son écologie dans le milieu mais également quant à son impact potentiel sur les espèces natives du lac.

L'objet de cette étude vise à caractériser la colonisation spatiale et l'activité du silure de manière journalière et annuelle dans ce lac.

C'est pourquoi les « Pop-up satellite archival tags » (PSAT-tag) ont été sélectionnés pour ce projet afin de suivre à haute fréquence la température et la profondeur auxquelles évolue le poisson marqué dans son milieu sauvage mais également pour enregistrer son accélération. Le tag est fixé de manière externe au niveau des muscles dorsaux par deux points d'ancrage et de chaque côté de la nageoire dorsale.

Dans le cadre du respect de la règle des 3R, ce type de tag est avantageux pour plusieurs raisons il ne nécessite pas la recapture des individus pour récupérer les données et donc de manipuler une deuxième fois les individus. Il est programmé pour se décrocher du dos du poisson et remonter à la surface à la fin du suivi. Il envoie par satellite ses informations seulement au moment de la remontée en surface, il est donc possible de le récupérer et le redéployer plus tard. Egalement, de par des mesures haute fréquence répétées, il permet de réduire au maximum le nombre de poissons marqués tout en gardant des données scientifiquement fiables.

Ainsi, pour caractériser au mieux l'activité des Silures et en étant conforme à la règle des 3Rs dans le lac 38 individus seront marqués. Deux types de suivis sont envisagés et différentes techniques de marquage et relargage sont utilisées afin de réduire au maximum la manipulation et la potentielle souffrance de l'animal

1) Un suivi court terme (4 à 8 semaines) sur 30 individus (marqués entre avril et septembre 2020 et 2021) à très haute fréquence (enregistrement toutes les 5 secondes) avec un tag fixé par fil vétérinaire résorbable et un relargage par résorption naturelle du fil.

2) Un suivi long terme (1 an) sur 8 individus (marqués en août 2020) à haute fréquence (enregistrement toutes les 30 minutes), avec un tag fixé par nylon mono-filament vétérinaire et un relargage programmé de manière électronique.

Les animaux marqués seront des animaux sauvages capturés dans le lac par pose de lignes de fond durant des pêches scientifiques ou par pêche à la ligne avec des pêcheurs confirmés et habitués à la pêche au Silure. Les pêcheurs professionnels et amateurs seront mis au courant de l'expérimentation qui aura lieu dans le lac et auront la possibilité de nous contacter en cas de pêche d'un Silure marqué.

Les Silures marqués seront des Silures adultes (sexe indifférent) mesurant au minimum 1 mètre et pesant au minimum 7 kg (respect du ratio Poids_TAG = maximum 2% du Poids_POISSON).

Dans le respect de la règle des 3 R, le nombre d'individus (38 en tout) a été déterminé afin de réduire au minimum le nombre d'animaux sans compromettre l'analyse statistique des résultats (réduction). Le remplacement n'est par contre pas possible car l'étude doit se faire obligatoirement en milieu naturel avec l'espèce sauvage puisqu'il s'agit d'une analyse de comportement d'un animal sauvage. Concernant le raffinement, le Tag sera fixé sous anesthésie sur animaux en bonne santé uniquement. Suite à l'anesthésie/opération qui durera au maximum 7 minutes, les animaux seront

placés dans un bac de réveil (bac souple de 1.8x0.5x0.8 m³, température équivalente à celle du milieu, saturation en O₂ > 80 %) et surveillés jusqu'à restauration d'un état vigile normal.

14647 La stéatose hépatique est une lésion du foie correspondant à la surcharge de graisse dans le cytoplasme des hépatocytes. Elle s'accompagne d'une inflammation hépatique et du développement progressif d'une fibrose lésionnelle. La prévalence de la stéatose hépatique est estimée entre 20 % et 30 % dans les pays développés. Il s'agit donc d'une pathologie extrêmement fréquente. Sa prévalence tend de plus à augmenter parallèlement à l'accroissement de la population obèse et/ou diabétique.

L'étude décrite dans le présent dossier sera réalisée dans le cadre du développement d'une série de composés en développement destinés à l'amélioration de la stéatose hépatique associée à l'obésité. L'objectif de la présente étude sera d'évaluer l'impact de ce composé sur la prise alimentaire, le poids corporel, la glycémie et l'inflammation/fibrose hépatique chez des souris rendues obèses par un régime stéatogénique (40% de l'énergie issue des graisses, 20% issue de fructose) pendant 30 semaines. Les animaux seront réceptionnés préconditionnés après 19 semaines de régime chez le fournisseur et le traitement sera administré par voie orale pendant les 8 dernières semaines de régime (T1 à T56). Au cours du traitement, les paramètres suivants seront mesurés : poids corporel, prise alimentaire, glycémie, taux des hormones hépatiques ALT et AST. A l'issue du traitement les souris seront mises à mort et leur foie prélevé pour réaliser une analyse histologique et des dosages biochimiques.

La présente étude nécessitera l'emploi de 120 souris C57Bl/6 réparties en 8 groupes expérimentaux de 15 animaux.

La règle des 3Rs a été prise en compte dans l'élaboration du présent protocole :

- Raffinement : Le modèle animal qui sera utilisé est un modèle parfaitement caractérisé dans la littérature et couramment utilisé dans les études précliniques cherchant à mettre en évidence les effets bénéfiques de composés sur la prise alimentaire, le poids corporel et la stéatose hépatique. Le protocole a été planifié de façon à limiter au maximum tout stress et tout inconfort pour les animaux. Les animaux seront hébergés en cages collectives (3 souris/cage) et un enrichissement du milieu sera assuré par l'ajout d'igloos et de matériels de nidification. Enfin, un suivi journalier des animaux à l'aide d'une grille de score permettra une action rapide en cas d'atteinte des points limites établis.

- Réduction : Le nombre d'animaux utilisés a été rationalisé à partir de l'expérience acquise par notre laboratoire sur l'analyse des paramètres d'intérêt. Ainsi, le nombre d'animaux par groupe a été adapté pour chaque série expérimentale en fonction des paramètres d'intérêt de façon à être en mesure de mettre en évidence une différence statistiquement significative sur les paramètres étudiés.

- Remplacement : L'utilisation d'animaux à des fins scientifiques se justifie ici car il n'existe aucune méthode de substitution n'utilisant pas l'animal de laboratoire et permettant l'étude de l'impact d'un composé sur le poids corporel, la prise alimentaire et la stéatose hépatique.

14648 Entre les repas ou lors d'un jeûne, l'organisme est capable de maintenir le taux de glucose (sucre) dans le sang (glycémie) à environ 1g/L, grâce à une production par le foie, les reins et l'intestin. Cette fonction est affectée dans le cadre d'une maladie métabolique la glyco-génose de type 1. C'est une maladie rare due à une absence de production de glucose, entraînant des hypoglycémies lors de jeûne court pouvant être fatales (coma ou mort). Ainsi, une dérégulation de la production de glucose a des conséquences sur le contrôle de la glycémie.

En plus des dérégulations de la glycémie, la glyco-génose de type 1 est caractérisée par le développement de complications hépatiques importantes telle que l'accumulation de graisses pouvant mener au développement de cancers hépatiques qui sont une des causes majeures de morbidité. La compréhension des mécanismes sous-jacents est nécessaire pour la mise en place de traitements adaptés. Ce projet devrait permettre de mieux définir les mécanismes moléculaires du développement tumoral en lien avec une stéatose et en présence ou non de fibrose hépatique.

Cette étude consistera à évaluer le développement de tumeurs hépatiques dans un modèle murin de glycogénose de type 1 dans des conditions favorisant le processus de développement tumoral. Le modèle animal étudié sont des souris transgéniques dont la production de glucose est inhibée uniquement dans le foie. Ces souris développent spontanément des tumeurs hépatiques entre 12 et 18 mois, mais en l'absence de fibrose ou de cirrhose et sans perte de la fonction hépatique. Elles devraient donc être plus sensibles au développement de tumeurs hépatiques induites par un carcinogène ou un régime spécifique que les souris contrôles (saines). L'évolution de la taille des tumeurs sera suivie par imagerie scanner hebdomadaire chez des souris atteintes de glycogénose de type 1 et des souris contrôles nourries avec un régime déficient en méthionine et en choline, ou après injection d'un carcinogène. Les voies moléculaires impliquées dans le développement tumoral seront analysées par l'analyse des foies et des tumeurs.

Ce projet sera réalisé selon le respect de la règle des 3R

Remplacement : Aucune approche en culture cellulaire ne permet de développer les tumeurs et les caractéristiques de la pathologie hépatique. Notre étude nécessite donc de travailler sur l'organisme en entier pour conserver le développement de ces tumeurs qui requièrent un dialogue complexe, entre divers types de cellules hépatiques, mais aussi avec d'autres organes. Elle sera donc réalisée chez la souris grâce à une approche de transgénèse qui permet de cibler des modifications du métabolisme uniquement dans le foie.

Réduction : Le nombre de souris a été calculé au plus juste à partir des connaissances des pathologies étudiées, des modèles animaux, et du métabolisme glucidique, mais aussi des résultats d'études précédentes ayant permis de valider la preuve de concept. Afin de pouvoir faire une analyse statistique, des groupes de 10 souris seront analysés. Au total, ce projet nécessitera l'obtention de 85 souris (mâles ou femelles) transgéniques et contrôles, sans compter les souris d'élevage qui ne développent pas de pathologie.

Raffinement : Les souris seront hébergées par groupe, dans un milieu enrichi pour favoriser la nidation. Les animaux seront pesés de façon hebdomadaire pour suivre leur prise de poids. La connaissance des modèles animaux a permis de définir des points limites, en contrôlant les risques d'hypoglycémie. Pour cela, les animaux auront accès à la nourriture directement dans la cage. L'atteinte des points limites lors d'une mise à jeun entraîne l'injection de glucose et la renutrition de la souris. Pour limiter les hypothermies liées au développement des hypoglycémies, les animaux auront la possibilité de se réchauffer en disposant une partie de la cage sur une plaque chauffante. La mise en place d'études « pilote » permettra d'évaluer les risques de développement tumoral précoce et ainsi de prévenir un mal-être des animaux. Le suivi du développement de tumeurs pourra être réalisé par imagerie scanner couplée à la palpation abdominale. Associé aux tests biologiques reflétant un dysfonctionnement du foie et au comportement des animaux, ce suivi des animaux permettra de mettre fin au protocole si les tumeurs sont trop nombreuses ou trop grosses ou si l'atteinte hépatique est importante. Les souris seront mises à mort à la fin du protocole ou lors de l'atteinte d'un point limite défini dans le projet selon les méthodes autorisées par la législation.

Ce projet devrait permettre de déterminer les voies moléculaires impliquées dans le développement de tumeurs hépatiques chez des souris atteintes de glycogénose de type 1. L'étude pilote permettra aussi de mettre au point les conditions d'imagerie au scanner nécessaire pour le suivi du nombre et de la taille des tumeurs.

14649 Les infections bactériennes pulmonaires sont responsables de nombreuses pathologies associées à une mortalité majeure. C'est le cas de la tuberculose (TB) qui est l'une des trois pathologies infectieuses à agent étiologique unique les plus meurtrières. Elle est causée par l'infection par voie aérienne de la bactérie *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) responsable de manifestations essentiellement pulmonaires. Parmi les axes principaux de recherche dans ces pathologies figurent la recherche de cibles thérapeutiques (sur l'hôte ou la bactérie elle-même) ainsi que la recherche d'un vaccin ou d'un nouveau vaccin plus efficace que le vaccin actuel (exemple du BCG pour TB). Notre équipe contribue à ces deux axes de recherche en tentant de comprendre les mécanismes de l'interaction hôte-pathogène dans la TB, ce qui implique l'utilisation de modèles cellulaires et animaux d'infection par Mtb. Par ailleurs, notre intérêt se porte sur l'immunité pulmonaire en général

et en particulier sur l'impact des populations de cellules lymphoïdes déjà présentes dans les poumons à l'initiation de l'infection par Mtb. Le présent projet s'inscrit dans ce cadre et vise à étudier l'implication de cellules lymphoïdes innées (ILCs), au cours de l'interaction hôte-bactérie dans différents modèles murins présentant des sensibilités différentes à TB, ainsi que des déficits développementaux sur les cellules d'intérêt pour nos études. Le nombre maximal d'animaux utilisé sera de 9600 souris.

Afin de s'inscrire dans la logique des 3R, nous avons intégré 4 étapes dans notre raisonnement.

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

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

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

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

Afin de prendre en charge la douleur générée lors de l'inflammation pulmonaire chronique induite par l'infection notamment chez des animaux immunodéficients, nous utiliserons des procédures déjà appliquées et validés sur le plan éthique dans nos projets antérieurs. Tous les animaux sont hébergés selon les normes d'éthique en vigueur et disposent d'enrichissement lors de la stabulation.

14650 Le but de cette étude est d'évaluer les conséquences d'une mutation au niveau du gène de la Dynamine 2, responsable chez l'homme de la maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT). La CMT est une maladie rare d'origine génétique qui affecte les nerfs périphériques et qui touche 30000 à 50000 personnes en France.

Par cette étude nous envisageons d'évaluer les conséquences fonctionnelles de cette mutation sur la maladie, dans des nouveaux modèles de souris myopathes dont les mutations génétiques reproduisent fidèlement les symptômes musculaires de patients atteints de myopathies centronucléaires. Dans un premier temps, une série de tests comportementaux seront réalisés, afin d'évaluer différents paramètres tels que la force musculaire, la position des pattes pendant le déplacement, la sensibilité à un stimulus mécanique et une électromyographie. Dans un deuxième temps, une analyse biomoléculaire et histologique sera réalisée dans le but de mieux caractériser la pathologie afin d'apporter une thérapie mieux adaptée.

Seul le modèle animal permet d'étudier d'une part la physiopathologie et d'autre part l'efficacité d'une thérapie (REPLACEMENT).

Des études cellulaires sont prévues afin de réduire au maximum le nombre d'animaux. Plusieurs procédures expérimentales, max. une PE/jour, seront réalisées chez les mêmes souris et les deux pattes (muscles) seront analysés, de plus, le nombre d'animaux sera réduit au maximum pour obtenir une puissance statistique suffisante. Ainsi nous pouvons avancer que 10 souris au maximum par groupe seront nécessaires pour conclure sur le projet (REDUCTION). Pour cette étude, 50 souris seront nécessaires dont 40 souris pour les expériences et 10 souris pour la reproduction.

Cette maladie peut entraîner des difficultés pour se déplacer, de la nourriture sera placée dans la cage. Afin de s'assurer que les animaux ne souffrent pas, un contrôle quotidien sera effectué. Tout signe de douleur sera pris en charge en prenant les mesures appropriées en fonction du niveau de douleur observé. Pour le nouveau-né, l'évaluation de la douleur sera évaluée visuellement : capacité

à se retourner, couleur de la peau, capacité à se mouvoir. A partir du sevrage, une perte de poids de 20% en une semaine conduira à la mise à mort. Le suivi du poids se fera 3 fois par semaine soit un analgésique sera administré, soit les animaux seront euthanasiés prématurément si nécessaire (RAFFINEMENT).

14651 Le pancréas est actuellement le quatrième site de mortalité par cancer dans l'UE pour les deux sexes, ayant récemment dépassé les taux de cancer de l'estomac chez les deux sexes et les taux de cancer de l'utérus chez les femmes. Le cancer du pancréas présente également des taux de mortalité défavorables et son incidence est en très forte augmentation depuis 1980. Le cancer du pancréas est une tumeur de très mauvais pronostic. Lorsque le diagnostic de cancer de pancréas est porté, la survie à 5 ans est inférieure à 5 %.

Le projet s'inscrit dans le cadre de l'activité d'une plateforme de services et représente un ensemble d'études types pouvant être demandées par des chercheurs clients de la plateforme. Les études pourront viser à comprendre des mécanismes impliqués dans la progression tumorale ou à évaluer l'efficacité thérapeutique de nouveaux traitements dans des modèles de cancer du pancréas.

Le projet qui se déroulera sur 4 ans pourra comporter jusqu'à 20 études correspondant à 20 demandes soit une moyenne de 5 demandes de client par an. Une étude comportera jusqu'à 80 souris ce qui portera le nombre d'animaux à 1600 souris maximum sur 4 ans. Les dommages attendus sont liés au développement d'une tumeur de cancer du pancréas et éventuellement à l'apparition de foyers tumoraux secondaires (métastases). Un suivi rigoureux des animaux, une excellente connaissance des modèles et la définition de points limites adaptés permettront de prendre en charge les éventuels stress et douleurs occasionnés. Les animaux seront sous anesthésie générale durant les actes d'induction des tumeurs ainsi que pendant les examens d'imagerie. Ils recevront un traitement antalgique post opératoire visant à réduire la douleur liée à l'induction.

Ce projet qui mettra en oeuvre des approches par imagerie *in vivo* sera réalisé en respectant la règle des 3R

Raffinement les animaux seront étudiés par imagerie *in vivo* non invasive, pratiquée sous anesthésie générale, ce qui n'induit pas de douleur et permet de réduire le stress infligé au cours de l'expérimentation.

Réduction la mise en œuvre de l'imagerie permet de réaliser un suivi longitudinal des animaux et ainsi de réduire le nombre d'animaux nécessaires à l'obtention de données exploitables.

Remplacement les informations attendues ne peuvent pas être obtenues *in vitro* car à ce jour l'animal de laboratoire reste le seul recours permettant d'étudier le développement tumoral et l'efficacité thérapeutique en tenant compte de la complexité de la physiologie d'un organisme vivant.

14652 La communauté scientifique utilise le rat comme modèle animal pour faire progresser la recherche biologique et médicale.

Notre laboratoire propose différentes prestations permettant la conservation et la décontamination (rederivation) de lignées de rats.

Ces précieux modèles correspondent à des lignées génétiquement modifiées qui ne sont pas disponibles dans les établissements fournisseurs d'animaux de laboratoire.

La conservation des lignées se fait sous forme d'embryons congelés dans l'azote liquide à -196°C elle permet de redémarrer à tout moment un élevage si besoin et de bénéficier de modèles animaux déjà existants pour l'ensemble de la communauté scientifique.

Par année, nous pensons effectuer au maximum 30 prestations de congélations d'embryons ce qui correspond à l'utilisation de 2020 animaux.

Le service propose également une prestation de décontamination/rederivation de lignées rat transgéniques et/ou mutantes afin d'obtenir des animaux à statut sanitaire EOPS (Exempt d'Organismes Pathogènes Spécifiques).

Nous estimons utiliser au total 380 rats soit 20 lignées décontaminées maximum par an.

La règle des 3R est mise en application pour ce projet

-Réduire = -éviter le maintien inutile sous forme respirantes des lignées quand le chercheur a fini son étude grâce à la cryopreservation d'embryons

-Raffiner = - l'utilisation d'animaux ayant un statut sanitaire contrôlé évite les interactions scientifiques.

-tout les animaux utilisés pour ce projet ont un enrichissement de milieux afin d'améliorer leurs conditions d'hebergements.

-toutes les micros-chirurgies lié à ce projet sont réalisés sous anesthésie générale avec ajout d'analgésique si besoin.

-nous disposons de points limites adaptés et prédictifs pour le suivie quotidiens des rats utilisés pour ce projet.

-Remplacer= au lieu d'utiliser des femelles sentinelles conçu uniquement pour la réalisation des contrôles sanitaire, nous remplaçons ses dernières par les mères porteuses dès le sevrage de leurs petits elles sont sorties de l'isolateur pour effectuer un contrôle sanitaire.

Pour les 2 types de prestations (= 50 prestations au total) nous utilisons par an au maximum

-2000 femelles donneuses (femelles porteuses d'une ou plusieurs modifications génétiques fournit par le chercheur ou des femelles spragues dawley ou long evens fournit par un laboratoire (le choix de la lignée est definit par le chercheur en fonction du fond genetique de sa lignée) mis en accouplement avec les mâles donneurs

-250 mâles donneurs (mâles porteurs d'une ou plusieurs modifications génétiques fournit par le chercheur et mis en accouplement)

- 10 mâles vasectomisés (vasectomie=Section chirurgicale des canaux déférents permettant la stérilisation tout en maintenant la fonction érectile du pénis) par an pour la production des femelles pseudos gestantes (les femelles pseudos-gestantes seront ensuite réimplantées avec des embryons soit pour réaliser un test de viabilité (vérifier la capacité d'un embryons congelés à se régénérer in-vivo) dans le cas d'une prestation de cryoconservation ou pour obtenir des petits pour une prestation de décontamination/rederivation.

- 140 femelles « nourrices » (femelles pseudogestantes) qui porterons les embryons reimplantés.

Pour l'ensemble des 50 prestations qui sera effectuées par le service cryoconservation/décontamination, nous estimons la quantité totale d'animaux utilisés pour 5 ans à 12000 rats maximum soit 2400 rats par an.

Les douleurs engendrées aux animaux sont soit l'injection d'hormones en mode intra-péritonéale (à raison de 2 injections à 48h d'intervalle), soit l'injection d'anesthésique en mode intra-péritonéale de façon à réaliser la réimplantation d'embryons et la vasectomie qui sont des opérations chirurgicales de courte durée.

Les avantages de la cryoconservation et /ou décontamination de lignées rats est de permettre de conserver et/ou de fournir à tous les utilisateurs un modèle rat avec des conditions sanitaires idéales pour mener à bien les études.

14653 Le traitement des troubles de l'anxiété et du stress dans notre société est un enjeu de santé publique majeur. Les récepteurs de l'ATP appelés P2X sont présents à la surface de nombreux types de cellules dans le cerveau et leur activation module la transmission des informations nerveuses. Ils sont impliqués dans de nombreuses pathologies du cerveau dans lesquelles l'expression de surface des récepteurs P2X4 est fortement augmentée. Afin de mieux comprendre son rôle nous avons récemment créé et caractérisé une lignée de souris permettant d'augmenter l'expression de P2X4 à la surface de certaines cellules mimant ainsi la situation pathologique. Notre projet a pour objectif de comprendre quel est le rôle des récepteurs P2X4 dans la réponse au stress liée à l'exposition à un stress modéré et d'en définir les remodelages cellulaires. Ce projet pourra permettre de cibler le récepteur P2X4 pour lutter contre les troubles de l'anxiété.

Pour cela, nous proposons d'utiliser plusieurs souris transgéniques, toutes issues de la souche sauvage C57BL6. Les souris transgéniques utilisées seront des souris mâles et femelles dont on a modifié un gène de façon à ce que les récepteurs P2X4 soient absents d'un type cellulaire ou au contraire présent en plus grand nombre à la surface des cellules. Nous utiliserons 8 types de souris présentant ces modifications (absence ou surexpression de P2X4) soit dans toutes les cellules soit dans un type cellulaire mais aussi des souris contrôles de chaque groupe des deux sexes pour comparer les résultats. Nous exposerons ces animaux à un environnement stressant pendant 30 min afin de générer un stress modéré et étudierons l'impact des récepteurs P2X4 sur la réponse au stress 1) en mesurant l'activité électrique des neurones du cerveau par la technique d'électrophysiologie *in vitro* et *in vivo* sur animal anesthésié puis 2) des analyses post-mortem pour identifier les corrélats cellulaires afin de déterminer si le récepteur P2X4 peut représenter une cible thérapeutique pour lutter contre le stress et les troubles de l'anxiété.

Il n'existe actuellement pas de méthode alternative permettant de remplacer l'utilisation de souris car ce projet repose sur la réponse comportementale et cellulaire suite à l'exposition ou non, des animaux à un nouvel environnement. L'ensemble de ce projet nécessite l'utilisation de 880 souris C57BL/6 mâles et femelles, réparties en 8 lignées transgéniques différentes et contrôles dont l'étude sera répartie sur les 5 années du projet. Afin de limiter le nombre d'animaux, chaque animal utilisé pour les études *in vivo* servira également aux approches *in vitro* faites à partir de nombreux prélèvements effectués post-mortem. Cela nous permettra de réduire au maximum le nombre de souris utilisées tout en conservant une significativité scientifique statistique. Des groupes d'animaux seront toutefois nécessaires pour réaliser les approches *in vitro* immédiatement après l'exposition au nouvel environnement. Ainsi, le nombre de souris utilisé dans chacun des groupes expérimentaux ne dépassera pas 12 animaux. Les animaux seront hébergés au sein d'un établissement utilisateur agréé dans des conditions d'hébergement favorisant leur bien-être (cages collectives enrichies avec des objets adaptés changés de façon hebdomadaire). Les animaux seront utilisés moins de 1,5 h après l'exposition au stress limitant au maximum l'inconfort des animaux. Afin d'assurer le bien-être des animaux, les animaux seront suivis quotidiennement par du personnel qualifié et nous définirons des points limites suffisamment précoces et mettrons en place des critères d'arrêts.

14654 L'objectif de ce projet vise à déterminer l'effet de la modulation de gènes cibles sur la fibrose hépatique induite par un régime spécifique.

La fibrose hépatique est la conséquence de mécanismes, de réparation tissulaire et de réactions inflammatoires chroniques et non résolus. Elle est caractérisée par une augmentation du dépôt de protéines matricielles qui désorganisent l'architecture des organes touchés. La fibrose hépatique est une résultante commune aux pathologies chroniques du foie, qu'elles soient d'origine virale (hépatite C), parasitaire, biliaire, auto-immune ou consécutive à une stéatohépatite (accumulation de graisse dans le foie) alcoolique ou non alcoolique (NASH).

Pour étudier les mécanismes biologiques on a généralement recours aux modèles transgéniques constitutionnels qui surexpriment ou qui sont démunis pour un gène. De tels modèles transgéniques transitoires et spécifiques pour un tissu ou un organe cible peuvent être créés par le transfert de gènes qui seront véhiculés par des particules virales créées en laboratoire. Leur administration aux animaux va permettre de produire de manière temporaire sans effets toxiques ou réaction immunologique la régulation des gènes choisis chez l'animal.

La fibrose est multifactorielle et se traduit par la dérégulation d'un certain nombre de gènes entraînant la pathologie. La compréhension de l'effet de la modulation de gènes cibles permettra de cibler de façon plus précise des traitements qui pourraient s'avérer efficaces. L'objectif à plus long terme serait de cibler ces gènes dont la modulation est pro-fibrotique, avec des molécules spécifiques afin de traiter la fibrose. L'expression des gènes sera modulée par infection virale (adeno-associated virus) permettant soit de diminuer, soit d'augmenter l'expression de gènes cibles, informations recueillies lors de la mise au point, de la caractérisation du modèle et de l'effet de la modulation de l'expression de gènes cibles.

La mise au point de ce modèle hépato-spécifique sera réalisée au cours de la durée de 5 ans couverte par ce projet avec 10 000 souris.

Les procédures utilisées sont adaptées afin d'optimiser le nombre d'animaux à engager dans les protocoles expérimentaux. En effet, en respect de la règle du raffinement, un ajustement strict du nombre d'animaux est effectué afin de maximiser les informations recueillies lors de la caractérisation. Les procédures réalisées sur les animaux dans ce projet sont d'une gravité modérée, et il n'est pas envisagé que le modèle montre des signes évident de douleur. Cependant les effets indésirables plutôt d'inconfort qui pourraient être observés pendant la période qui suit les injections seront contrecarrés le cas échéant par l'utilisation de dispositifs de chauffage (lampe ou tapis chauffant) pour améliorer la récupération de l'animal pendant la période de recovery.

Les points limites sont décrits en 3.4.13, une surveillance accrue sera pratiquée dans le cas où une dégradation de l'état général des animaux est constatée.

De plus, il ne sera effectué sur les animaux que le nombre strict de prélèvements sanguins, en volume et en fréquence, compatibles avec la physiologie de l'animal. Les animaux seront sous observation quotidienne et aucun animal en détresse ou en souffrance ne sera maintenu dans cet état, il serait euthanasié par une méthode humaine adaptée le cas échéant.

14655 La maladie de Crohn est une maladie inflammatoire chronique de l'intestin (qui évolue par poussées et phase de rémission) dont le nombre de nouveaux cas est en augmentation dans la population générale. Les traitements disponibles ont largement amélioré la prise en charge de la maladie. Cependant, de nombreux patients sont réfractaires à ces traitements, ce qui nécessite la mise en place de nouvelles alternatives thérapeutiques. L'Imatinib, une molécule utilisée dans le traitement des leucémies myéloïdes chroniques, a également apporté des effets bénéfiques dans le traitement de maladies inflammatoires telle que la maladie de Crohn. La toxicité de l'Imatinib est donc connue et son mode d'action aussi. L'objectif du travail n'est donc pas de tester la toxicité du produit mais de comprendre l'impact de l'Imatinib sur la perméabilité intestinale (porosité de l'intestin) induite chez l'animal, avant de le proposer à une population de malades.

Dans la maladie de Crohn, il y a une cascade de mécanismes associant notamment une augmentation de la perméabilité de l'intestin vis-à-vis des bactéries présentes dans le tube digestif. Des études effectuées sur la perméabilité *in vitro* sur des lignées cellulaires intestinales ont permis d'avancer sur la compréhension du mode d'action de l'Imatinib. Cependant il reste à comprendre ce qu'il en est au niveau d'un organisme entier, notamment en étudiant la perméabilité de la barrière intestinale *in vivo*.

Nous utiliserons dans ce protocole deux modèles d'augmentation de perméabilité intestinale la carence nutritionnelle chez la souris pendant 24h et une souris mutée pour un gène prédisposant à la Maladie de Crohn. Ces deux modèles ne présentent aucun phénotype dommageable. Les souris seront traitées 3 jours de suite par gavage avec de l'imatinib et seront mis à jeun 24h ou non. Ce projet, d'une durée de 2 ans, nécessitera un effectif total de 108 souris.

La première procédure, comprenant 72 souris, consistera à évaluer la perméabilité intestinale *ex vivo* sur des biopsies d'intestin grêle prélevées après l'euthanasie.

La deuxième procédure, comprenant 36 souris, évaluera la perméabilité intestinale *in vivo* en administrant sur animale vigile et par gavage avec une sonde souple non traumatique, une solution fluorescente non toxique.

Ce projet respecte naturellement la règle des 3R.

_ Réduire Dans le but de diminuer le nombre d'animaux utilisés, nous avons réalisé le maximum des expériences *in vitro* sur un modèle de cellules intestinales humaines. Une justification statistique prédictive du nombre d'animaux nécessaire par groupe a été établie à partir de travaux similaires réalisés. Un minimum de 12 animaux par groupe pour la première procédure est ainsi nécessaire pour mettre en évidence un résultat statistiquement significatif. Dans la deuxième procédure, 6 animaux par groupe sont nécessaires.

Pour chaque procédure six groupes seront évalués, (groupe contrôle, groupe Imatinib, groupe carence nutritionnelle, groupe carence nutritionnelle + Imatinib, groupe souris mutée, groupe souris mutée + Imatinib)

_ Remplacer Les modèles *in vitro* ne permettent pas de modéliser la complexité de la réponse d'un organisme entier, face à l'administration de molécules thérapeutiques. Une exploration *in vivo* et *ex vivo* de la perméabilité intestinale est primordiale.

_ Raffinement Chaque procédure expérimentale commence par une période d'acclimatation d'une semaine. Les souris sont traitées par gavage avec de l'Imatinib pendant trois jours. Pour le modèle de carence nutritionnelle, les souris seront mises à jeun sur des grilles adaptées pendant 24h avec accès libre à l'eau de boisson avant euthanasie. La deuxième procédure permettra une exploration *in vivo* de la perméabilité intestinale en administrant par gavage une solution fluorescente non toxique et en mesurant sa concentration 4 heures après avec un prélèvement de sang au niveau de la veine faciale. Les procédures de gavage seront réalisées par un personnel expérimenté, avec une sonde de gavage en plastique à usage unique non traumatique de 20G.

Les animaux seront surveillés quotidiennement par un personnel qualifié et les points limites seront notés tous les jours pendant la procédure par l'opérateur. Des points limites précoces et adaptés au projet ont été définis. S'ils sont atteints, des actions adaptées seront mises en place.

14656 À l'échelle mondiale, l'accident vasculaire cérébral (AVC) est la 3ème cause de mortalité et la première cause de handicap acquis chez l'adulte. Face ce fardeau, les seuls traitements approuvés sont l'administration de l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) et/ou une intervention endovasculaire la thrombectomie. Cependant, une fenêtre thérapeutique courte et un manque d'unités de soins spécialisées font que la disponibilité de ces traitements concerne une minorité des patients (<10%). Ainsi, il paraît indispensable de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques innovantes.

De nombreuses études ont évalué l'efficacité d'un grand nombre de ces stratégies ayant montré des effets neuroprotecteurs dans des modèles expérimentaux, mais n'ayant jamais débouché sur des traitements efficaces en clinique. Cela a vivement alimenté le débat sur la valeur prédictive des modèles animaux utilisés. Bien qu'une grande amélioration ait été observée dans la gestion et le design des études précliniques ces dernières années, trop peu d'études s'intéresse aux acteurs clés du développement de la pathologie que sont les facteurs de risque comme le diabète, l'hypertension et l'âge. L'objectif de ce projet est donc d'étudier dans un modèle d'AVC le plus proche biologiquement de la réalité clinique l'impact des facteurs de risques sur l'évolution de la pathologie afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

Nous étudierons l'impact de trois principaux facteurs de comorbidités que sont l'hypertension artérielle (52% d'hypertendus chez les patients AVC), le diabète (25% des patients touchés par un AVC sont diabétiques) et le vieillissement. Notre objectif secondaire est de produire une cohorte multivariée d'animaux souffrant d'AVC incluant les principales caractéristiques épidémiologiques et de comorbidités en proportion similaire à celles observées en clinique.

D'après la littérature et une analyse de puissance statistique, le projet dans son ensemble nécessitera 710 souris mâles Swiss adultes (10 à 12 semaines) et 50 souris mâles Swiss adultes (10 à 15 mois).

L'espèce, le stade de développement et le genre ont été choisi en accord avec la littérature du domaine ainsi que de la pertinence scientifique. Nous choisissons donc de travailler avec la souris car l'ensemble des connaissances et des acquis dont nous disposons dans la littérature font de cet animal le modèle préférentiel pour mener à bien ce projet. En effet, la souris est l'espèce animale la plus étudiée dans le domaine de l'AVC ce qui permettra une analyse comparative et critique des résultats obtenus.

Cette étude prend en compte le bien-être des animaux, les pratiques éthiques et répond à la règle des 3R La Réduction du nombre d'animaux utilisé est prévue par une limitation aux seules expériences considérées comme absolument indispensables, et par l'emploi d'une analyse de puissance statistique pour définir les groupes d'animaux, avant toute expérimentation. Dans ce

projet il n'est pas possible de Remplacer le modèle animal, il s'agit de mettre en place un nouveau modèle préclinique animal, et de tester des molécules déjà validées *in vitro* ayant prouvé leur efficacité en clinique (t-PA). En amont de l'expérience, pour Raffiner l'expérimentation le modèle animal utilisé a été choisi avec soin, les conditions de transport, d'élevage et d'hébergement sont optimisées (cages standards aux normes européennes avec litière enrichie), le protocole est planifié pour éviter le stress, les animaux sont entraînés à coopérer pour les actes non invasifs et non douloureux. Nous avons établi des points limites (ou critères d'arrêt anticipé) de la procédure. Le Raffinement concernant les méthodes et les procédures opératoires seront assuré par l'emploi de procédures non invasives (IRM, ultrasons...) dès que possible, par des soins adéquats avant, pendant et après l'opération et par l'utilisation d'anesthésie/analgésie. Le Raffinement de l'étude sera également assuré par la réduction maximale de la durée de l'expérimentation et par l'emploi de procédure de mise à mort appropriée.

14657 Dans le cadre de leurs recherches et de tests *in vitro*, les scientifiques ont régulièrement besoin de sang de poulet exempt d'organisme pathogène spécifique (EOPS) pour entre autre

- isoler des cellules immunitaires comme les leucocytes pour des tests *in vitro*
- isoler des globules rouges et réaliser des tests d'hémagglutination pour le titrage de virus
- Produire du sérum pour réaliser des études de croissance bactérienne

Un maximum de 250 prélèvements sont réalisés par an. Chaque série de prélèvements concerne au maximum 20 individus.

Chaque animal n'est concerné que par un prélèvement sans répétition, ce qui fait qu'au maximum 1250 animaux seront concernés par ces prises de sang sur la période de 5 ans.

Remplacement l'objet de la demande est la fourniture de sang de volaille EOPS comme réactif, le recourt à l'animal est donc nécessaire.

Réduction Les prélèvements sont réalisés sur des animaux inclus dans le planning d'élevage de l'animalerie EOPS (reproducteur et animaux destinés à la fourniture d'animaux expérimentaux. De ce fait les animaux ne sont pas produits et utilisés exclusivement pour la fourniture de sang. De plus le nombre d'animaux prélevés est adapté au volume de sang nécessaire.

Raffinement les animaux (les poules uniquement) sont hébergés en groupe et bénéficient d'un enrichissement physique : perchoir et nid.

14658 Les plaies qui ne guérissent pas représentent un problème sanitaire majeur à travers le monde. Dans des circonstances normales, une blessure de la peau entraîne une réponse inflammatoire contrôlée ainsi qu'une réponse réparatrice qui permettent d'une part d'éradiquer les pathogènes potentiels présents dans la plaie et d'autre part de restaurer l'intégrité de la barrière épithéliale. Cependant, chez les patients atteints de plaies chroniques, la réponse inflammatoire est soit inefficace soit exagérée, ce qui résulte en la formation d'un tissu anormal et d'un défaut de la barrière épidermale sur le long terme. Comprendre les mécanismes qui initient et régulent la réponse inflammatoire dans les plaies cutanées est donc d'un grand intérêt pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques et préventives. Nous avons récemment observé que les blessures cutanées de souris pré-traitées topiquement avec des antibiotiques ont une réponse inflammatoire altérée et cicatrisent plus lentement ce qui suggère que les bactéries commensales normalement présentes sur la peau participent à la bonne cicatrisation cutanée. Afin d'identifier quelles sont les bactéries commensales présentes normalement sur la peau qui permettent une cicatrisation efficace des blessures cutanées, nous devons investiguer la réponse inflammatoire dans la peau lésée de souris axéniques qui sont dépourvues de tout germe, re-colonisées ou non avec différentes bactéries commensales.

Pour cela nous constituerons 9 groupes de 5 souris soit un total de 45 souris qui seront utilisées pour une expérience qui durera 4 jours. Un groupe de souris restera axénique dépourvu de bactéries, 1 groupe de souris sera re-colonisé avec le microbiote cutané complet issu de souris conventionnelles, et 7 groupes de souris seront re-colonisées avec 7 bactéries commensales différentes. Pendant les 3 premiers jours, les souris seront re-colonisées en peignant le dos des

souris avec une solution grasse contenant les bactéries. A la fin du 3ème jour, une petite lésion de 2mm de diamètre sera faite sur le dos des souris préalablement rasées. Enfin, 12 heures plus tard, le 4ème jour, les souris seront mises à mort pour prélever la peau lésée pour analyser la réponse inflammatoire. Pendant toute l'expérience, une grille de score du mal-être animal sera utilisée afin de terminer l'expérience si un animal montre des signes de souffrance.

Cette étude a été élaborée en respectant au maximum la règle des 3R

Réduire. Il existe des dizaines d'espèce de bactéries commensales sur la peau normale. Pour déterminer quelles sont les espèces qui ont un rôle positif dans la cicatrisation cutanée, nous avons sélectionné seulement 7 bactéries différentes à tester, les plus abondantes, afin de réduire le nombre d'animaux à utiliser. Nous devons également inclure un groupe contrôle positive (re-colonisé avec le microbiote complet) et négatif (aucune bactéries, axénique) pour pouvoir conclure les analyses sans ambiguïté. Un nombre de 5 souris par groupe est le minimum pour détecter des différences statistiques. Nous avons également décidé d'effectuer l'expérience qu'une seule fois.

Raffiner. Dans cette expérience de 4 jours, les souris seront re-colonisées pendant 3 jours ce qui n'entraîne aucun inconfort ni inflammation. C'est une colonisation topique, effectuée seulement à la surface de la peau, qui n'est donc pas invasive. La dépilation et l'induction de la blessure cutanée se feront sous anesthésie. La blessure induite sur le dos sera faite avec un punch biopsie de 2mm qui est le diamètre le plus petit techniquement faisable de façon reproductible. Cette blessure minimale induit une faible irritation et ne sera présente que pendant 12 heures avant la fin de l'expérimentation. De plus la présence d'antalgique dans l'eau des souris réduira au maximum leur inconfort.

Remplacer. Ces expériences ne peuvent pas être effectuées *in vitro* sur des explants de peau humaine car 1/ il n'y a pas de système immunitaire *in vitro* qui puisse engendrer de réponse inflammatoire dans la peau, et 2/ l'utilisation de bactéries dans un système *in vitro* contaminerait la culture avec une prolifération incontrôlée des bactéries car seul la peau d'un organisme vivant peut contrôler la prolifération de bactéries commensales.

Les résultats de cette étude pourront améliorer la compréhension du rôle physiologique des bactéries commensales dans la réponse réparatrice des lésions cutanées et dévoiler leur potentiel à être ciblé pour le traitement de plusieurs maladies inflammatoires cutanées.

14659 Ce projet porte sur le développement et l'optimisation de transfert de gènes par l'utilisation de vecteurs synthétiques innovants dans le cadre de stratégies de thérapies géniques appliquées au traitement de myopathies comme la myopathie de Duchenne. Nous souhaitons ici évaluer l'efficacité du transfert de gènes *in vivo* de formulations et préalablement testées de façon approfondie en condition *in vitro*. Nos investigations nous ont permis de sélectionner différentes formulations représentant les candidates les plus intéressantes à tester au niveau des cellules musculaires. L'une des méthodes employées dans certaines études concernant la myopathie de Duchenne est une méthode hydrodynamique qui consiste à l'injection d'un volume important contenant la solution médicament. Cette méthode est localisée et n'impacte pas le reste de l'organisme.

Au cours de ce projet 310 souris Swiss seront utilisées. Ce nombre se répartie comme suit 60 lots de 5 souris qui auront les différentes formulations, un lot de 5 souris servant de contrôle et enfin un lot de 5 souris non injectées. L'administration se fait sur les deux membres postérieurs de la souris c'est pour cela que cette procédure est de classe modérée. Le suivi des animaux se fait par imagerie de bioluminescence car elle permet de limiter le nombre d'animaux nécessaires. En effet, par cette méthode, il est possible de réaliser plusieurs mesures sur un même animal. De plus, toutes les séances d'imagerie sont réalisées sous anesthésie gazeuse. Enfin, à la fin de la procédure certains animaux peuvent être gardé en vie afin d'intégrer un autre protocole permettant la réalisation d'imagerie par résonance magnétique (IRM).

Cette procédure s'insère dans le respect de la règle des 3R. Dans le cadre du remplacement, toutes nos expérimentations sont précédées d'une phase de test *in vitro* permettant de ne retenir que les molécules présentant les meilleures chances de succès. La réduction du nombre d'animaux est au

maximum sans mettre en péril l'obtention de résultats statistiquement exploitables. Ces expérimentations sont indispensables pour optimiser nos protocoles et nous permettre de faire un lien entre les résultats obtenus *in vitro* et un éventuel développement clinique. Le raffinement sera assuré notamment par des phases d'acclimatation, un enrichissement de l'environnement, un suivi quotidien des animaux ainsi qu'une gestion de la douleur suivant une échelle stricte et des points limites bien établis.

A la fin de la procédure, les animaux qui ne seront pas introduit dans le protocole IRM seront mis à mort par élongation cervicale.

14660 Le génome humain contient des virus naturellement présents mais généralement maintenus sous silence. Il est toutefois récemment apparu qu'une forte proportion de patients atteints de schizophrénie et de troubles bipolaires présente des taux anormalement élevés d'une protéine d'enveloppe du virus HERV-W, la protéine Env, qui pourrait perturber le fonctionnement cérébral et contribuer à l'apparition de ces maladies. Nous nous proposons dans ce projet de tester l'efficacité de molécules dirigées contre la protéine Env comme traitement de ces dysfonctionnements. Pour cela, nous allons modéliser cette maladie chez le rat en sur-exprimant à partir de la naissance la protéine Env dans les neurones d'une région du cerveau impliquée dans la formation de la mémoire et détériorée chez les schizophrènes. L'administration des molécules thérapeutiques dirigées contre la protéine Env se fera par injection intrapéritonéale à différents stades du développement. Plusieurs tests comportementaux seront ensuite menés entre le 35ème et le 58ème jour post-natal, période au cours de laquelle devraient apparaître les premiers symptômes pathologiques et où des altérations progressives des capacités cérébrales symptomatiques de la schizophrénie sont détectées. Ces tests nous permettront de mesurer les bénéfices possibles que nous escomptons de l'administration des molécules thérapeutiques dans la manifestation des troubles psychotiques. Les approches comportementales de ce projet pour mesurer des déficits sensoriels nécessitent d'utiliser des animaux. Les autres méthodes alternatives (« *in vitro* », modélisation) développées actuellement ne permettent pas de reproduire la complexité du cerveau et de l'animal se comportant (remplacement). Cependant, la règle des 3R a été mise en place dans la conception de notre projet et une planification précise des expériences a été établie afin de réduire au maximum le nombre d'animaux inclus dans cette étude, tout en ayant des groupes suffisamment importants pour obtenir des statistiques solides. Nous proposons ainsi un projet portant sur 522 rats (réduction), avec un nombre de 16 animaux par groupe déterminé comme nécessaire pour l'analyse des tests comportementaux et des approches biochimiques et immunohistochimiques sur les cerveaux prélevés post mortem chez les animaux traités et témoins. Une attention permanente sera portée au bien-être des animaux avant et tout au long des protocoles (raffinement), notamment en assurant un enrichissement adéquate de leur milieu : papier tressé pour les mères, tunnels en carton dans des cages d'hébergement conçues pour qu'ils puissent exprimer leur comportement naturel. Ils seront surveillés quotidiennement par des personnels compétents et formés. Les douleurs consécutives à la chirurgie seront soulagées à l'aide des molécules les plus adaptées au protocole et à l'état des animaux. Aucune des données recueillies sur les molécules à visée thérapeutique injectées par voie intrapéritonéale ne prédisent pas que ces injections seront douloureuses. Néanmoins, l'état des animaux sera particulièrement surveillé durant le temps de ces injections et des mesures adaptées seront prises dans la cas contraire. Les tests comportementaux utilisés dans ce projet ne provoquent pas de douleurs et sont peu contraignants pour les animaux. Des points limites suffisamment prédictifs sont définis pour limiter la souffrance tout au long de la vie de l'animal. En cas de souffrance ou de détresse persistante, les animaux seront mis à mort dans des conditions qui évitent souffrance et stress.

14661 Le mélanome dérive de la transformation maligne des mélanocytes. Le traitement du mélanome cutané repose sur une chirurgie locale pour retirer la tumeur primaire, mais celle-ci ne permet la guérison que des mélanomes diagnostiqués très précocement. A un stade métastatique, le pronostic est extrêmement péjoratif. Bien que des nouveaux traitements comme les thérapies ciblées et les immunothérapies aient été développées, la plupart des patients traités développent

des résistances à ces traitements et il n'existe pas de guérison d'un mélanome métastatique. Il est donc important de mieux comprendre les mécanismes moléculaires qui contrôlent la survie, la prolifération et la mort des cellules de mélanome afin d'améliorer les traitements existants.

Nous avons précédemment identifié dans le mélanome une hétérogénéité intra tumorale composée de cellules prolifératives et de cellules invasives dédifférenciées. Ces dernières sont plus résistantes aux thérapies ciblées, immunothérapies et expriment faiblement le facteur de transcription clé du développement et de la survie du mélanocyte et du mélanome, appelé Microphthalmia-associated Transcription Factor ou MITF. Nous nous sommes donc intéressés au rôle de MITF dans ces résistances. Au cours de notre étude *in vitro*, nous avons pu identifier une nouvelle protéine sécrétée bloquant l'activité anti-mélanome du système immunitaire. Cette protéine a été précédemment montrée comme jouant un rôle dans la mobilité des cellules tumorales, mais à ce jour aucune étude ne montre l'implication de cette protéine dans la régulation de l'activité du système immunitaire. Il est donc très important de valider et mieux comprendre le fonctionnement de cette protéine *in vivo* sur le système immunitaire afin de pouvoir proposer de nouvelles thérapies pour les patients.

Afin d'étudier son implication dans le développement du mélanome dans un contexte plus physiopathologique (*in vivo*) nous avons mis en place des cellules de mélanome sous exprimant ou surexprimant notre protéine d'intérêt. Nous observerons le développement de tumeurs et de métastases suivant l'expression ou non de notre protéine. Le but étant d'évaluer dans un premier temps les effets de l'expression de notre protéine dans le développement de tumeurs et de métastases. Pour finir, nous souhaitons évaluer des inhibiteurs de cette protéine (petites molécules ou anticorps bloquants), que nous allons développer. Nous réaliserons ces expériences de développement de tumeurs et de métastases sur des souris immunocompétentes et des souris immunodéprimées afin de mieux comprendre l'implication des différentes populations du système immunitaire dans le développement du mélanome.

En termes de remplacement, il n'est pas possible de s'affranchir de l'utilisation de souris car il n'existe pas de méthodes alternatives qui permettent de reproduire des interactions physiologiques aussi complexes. En termes de réduction, le nombre d'animaux nécessaire par groupe pour cette étude a été déterminé à l'aide d'un test statistique. Pour la réalisation de ce projet, il faudra 8888 souris. Les groupes contrôles sont mis en commun pour les différents traitements avec les inhibiteurs afin de réduire le nombre d'animaux. L'utilisation de ces animaux sera optimisée en prélevant les tumeurs/métastases et organes (tels que le foie, la rate, les poumons) pour des analyses histologiques et biochimiques. En termes de raffinement, les souris seront hébergées à plusieurs par cage avec un environnement enrichi et seront observées trois fois par semaine par les demandeurs du projet afin de prendre en charge tout signe de douleur, de stress ou d'inconfort. Les manipulateurs sont en possession du niveau opérateur qui permet d'avoir une bonne vision et une excellente capacité à détecter les problèmes de santé, stress ou malaise. Le suivi est fait par des méthodes non invasives (mesure des tumeurs sous cutanées au pied à coulisse, pesée des animaux régulières). Des points limites précis sont définis dans chaque procédure. En termes de remplacement, des tests *in vitro* seront effectués au laboratoire pour réduire le nombre d'inhibiteurs efficaces à tester *in vivo*.

Ce projet nous permettra donc de proposer une nouvelle stratégie thérapeutique pour les patients résistants aux immunothérapies.

14662 Contexte scientifique

Les maladies cardiovasculaires représentent la première cause de décès dans le monde. Malgré les progrès récents et la mise en place de stratégies thérapeutiques visant à diminuer le mauvais cholestérol dans le sang, plus de 17 millions de patients décèdent de pathologies cardiovasculaires chaque année. Récemment, l'inflammation est apparue comme une composante centrale contribuant au développement des maladies cardiovasculaires mais les mécanismes qui régissent cette inflammation restent inconnus. Le dérèglement des cellules immunitaires est souvent associé à la progression des maladies cardiovasculaires. Les cellules myéloïdes sont générées dans la moelle osseuse au cours d'un processus dynamique nommé l'hématopoïèse. Le métabolisme joue

un rôle clé dans la modulation de l'hématopoïèse et contrôle ainsi le nombre de cellules générées et façonne leurs fonctions. Ce projet vise à identifier et valider de nouvelles voies métaboliques, et notamment le rôle de l'enzyme glutaminase 1 (Gls1), qui contribuent à l'inflammation liée aux maladies cardiovasculaires.

Hypothèse de travail : Notre projet vise à enlever de manière sélective Gls1 au sein des cellules myéloïdes. Nous nous intéressons ainsi à la contribution de l'enzyme Gls1 sur l'hématopoïèse, le nombre et la fonction des cellules myéloïdes et son impact dans les maladies cardiovasculaires.

Justification du modèle : En condition physiologique les souris sont naturellement protégées contre l'athérosclérose. Afin d'étudier cette pathologie nous devons donc induire la mutation ApoE dans nos souris d'intérêts. Nous avons choisi ce modèle de souris car c'est un modèle standard, bien reconnu dans le domaine scientifique pour l'investigation de manipulations génétiques liées aux maladies cardiaques. Toutefois, toutes les procédures menées avec ce modèle seront interrompues avant l'apparition de signes cliniques douloureux pour les animaux. Ce projet fait aussi appel à des lignées de souris génétiquement modifiées qui ne présentent pas de phénotype dommageable (Gls1 fl/fl et LyzMcrc). De plus, des mesures de réduction et de raffinement sont prévues afin de limiter la sévérité des procédures.

Les 3R :

Remplacement Les maladies cardiovasculaires sont des pathologies complexes dans lesquelles de multiples voies métaboliques et physiologiques interviennent. De ce fait, une approche *in vivo* reproduisant ces interactions nous est indispensable pour répondre à notre problématique. De plus, l'étude du dépôt de cholestérol dans les artères ne peut être réalisé *in vitro*. Des modèles murins capable de développer de l'athérosclérose ont donc été développés et validés par la communauté scientifique comme outils d'études précliniques.

Réduction Notre approche statistique garantit l'obtention de résultats exploitables avec le plus petit nombre d'animaux possible. Dans le cadre de cette étude, et pour chaque groupe, nous utiliserons des souris mâles et femelles. Ceci permettra d'utiliser l'ensemble des animaux générés dans les élevages. Les résultats pourront donc être appliqués à la fois aux hommes et aux femmes. Ce projet prévoit l'utilisation de 336 souris sur 4 ans.

Raffinement La mise en place de points limites précoces, prédictifs et adaptés à chaque procédure, basés sur une observation détaillée des animaux au cours de chaque procédure permettront de limiter la sévérité de celles-ci. Les souris seront de plus hébergées en groupe (6 souris par cage) dans des cages enrichies (igloos, ouate, baguettes de bois à ronger).

Perspectives

Cette étude pourrait ouvrir de nouvelles perspectives de traitement des maladies cardiovasculaires en ciblant le métabolisme des cellules myéloïdes.

14663 La sclérose latérale amyotrophique (SLA) ou maladie de Charcot est une maladie neurodégénérative caractérisée par une paralysie progressive des muscles en raison de la mort progressive des neurones moteurs du cortex cérébral et de la moelle épinière. Son issue est toujours fatale et son étiologie demeure en grande partie méconnue. Néanmoins, sa survenue semble être multifactorielle et résulter d'interactions entre des facteurs génétiques et environnementaux. En effet, des mutations génétiques au niveau des cellules neuronales et non neuronales ont été impliquées dans la production de protéines toxiques. De plus, le déclenchement tardif de la maladie (vers 40-50 ans) et son évolution rapide (2-5 ans) suggèrent l'existence de facteurs déclencheurs et/ou aggravant. A ce jour, aucun facteur environnemental probant n'a été clairement mis en évidence. Cependant, le stress pourrait avoir un rôle important à jouer. Il a été décrit comme facteur ou cofacteur déclencheur et/ou aggravant de nombreuses pathologies neurodégénératives. Qu'il soit aigu ou chronique, il entraîne la libération d'hormones, pouvant favoriser un état pro-inflammatoire néfaste pour la survie neuronale. Dans ce projet nous souhaitons évaluer chez une souris génétiquement modifiée, pour être vulnérable à la SLA, l'impact d'un stress maternel prénatal sur la réorganisation des réseaux moteurs du cortex cérébral et de la moelle épinière. Nous souhaitons également déterminer les mécanismes par lesquels le stress

influencerait le fonctionnement de ces réseaux pour conduire à la dégénérescence précoce des neurones moteurs.

D'un point de vue méthodologique, nous nous engageons à respecter la règle des 3 R

- Remplacement quand cela est possible par des expériences complémentaires de simulations informatiques et de culture cellulaire

- Réduction Minimisation du nombre de femelles gestantes par l'utilisation de l'ensemble des animaux néonataux de la portée, et par l'augmentation du nombre d'échantillons et d'analyses effectués par animal. Un nombre minimum d'animaux sera programmé de façon à obtenir des résultats significatifs en accord avec les tests statistiques qui seront choisis et réalisés à posteriori.

- Raffinement Outre l'enrichissement du milieu, avec la mise à disposition de tunnels en carton, d'abris sombres, de matériaux de nidification diversifiés et d'une ambiance calme, particulièrement pour la femelle gestante. Toutes les dispositions permettant de préserver le bien-être des animaux seront prises. Notamment, le respect des points limites, adaptés aux différentes procédures, établis par les grilles de scorage (voir annexes), le contrôle strict de la profondeur de l'anesthésique et analgésique pour la stéréotaxie.

Dans son ensemble, notre projet est basé sur l'utilisation de 1096 animaux sur 5 années de recherche.

14664 Contexte scientifique Le microbiote intestinal joue un rôle clé dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Dans la maladie de Crohn (MC), certaines populations de bactéries bénéfiques pour l'hôte sont diminuées au sein du microbiote intestinal au détriment de bactéries dites 'agressives'. Parmi ces bactéries agressives, on retrouve des souches d'*Escherichia coli* adhérentes et invasives à potentiel pro-inflammatoire. Ces bactéries se fixent à l'intestin en reconnaissant une protéine anormalement exprimée à la muqueuse des patients MC.

Objectif du projet Les *E. coli* adhérents et invasifs ne portent pas de gène de virulence spécifique permettant de les détecter facilement par des techniques moléculaires. La méthode actuelle est basée sur des tests cellulaires pour évaluer leur comportement adhérent et invasif, des tests longs et compliqués à mettre en œuvre. L'objectif du projet est de tester une nouvelle méthodologie simple et rapide pour détecter ces bactéries dans des fluides biologiques par capture sur bandelette de papier.

- Durée du projet la durée totale du projet est de 6 mois, elle comprend le temps de génération des animaux transgéniques et la réalisation du projet scientifique.

- Modèle murin : Afin de réaliser ces études, nous avons recours à un modèle de souris portant un gène humain (souris transgéniques). Les souris expriment au niveau intestinal la protéine anormalement exprimée chez les patients favorisant l'implantation des bactéries *Escherichia coli* adhérentes et invasives. Elles ne présentent aucune altération du fait de la présence du transgène.

- Protocole Une inflammation légère est induite chez les souris par l'administration d'un produit dans l'eau de boisson. Les souris recevront les bactéries par gavage en une dose unique. Les animaux seront euthanasiés 24 heures après infection afin de prélever l'intestin. Les bactéries seront quantifiées soit par microbiologie classique, soit par la méthode de détection par capture sur bandelettes. Concernant les animaux non infectés, ils ne subissent aucun traitement avant euthanasie. Les prélèvements biologiques issus de ces animaux seront inoculés par les bactéries *in vitro*. Nous pourrions ainsi comparer l'efficacité de la méthode de capture des bactéries lorsqu'elles ont subi ou non un passage du tube digestif.

Ce protocole nécessitera au total 20 animaux transgéniques, mâles et femelles inclus. Comme il s'agit d'un modèle hétérozygote, il faudra générer environ 40 animaux pour obtenir 20 animaux porteurs du transgène. Le gène humain est détecté par amplification par PCR.

Les expériences seront réalisées dans le respect de la règle des 3R

- Remplacer : Cette étude intervient suite à la réalisation des tests *in vitro* qui ont permis de montrer que les *E. coli* adhérentes et invasives étaient préférentiellement capturées sur ces bandelettes comparativement à des *E. coli* non pathogènes. Il est nécessaire de poursuivre la mise au point de

ce test diagnostique sur en modèles précliniques, afin de placer les bactéries dans les conditions drastiques du tractus digestif et en présence du microbiote intestinal. De plus, les fluides biologiques dans lesquels se trouvent les bactéries peuvent influencer sur la capacité de fixation des bactéries aux bandelettes. Enfin, cela permettra d'estimer la sensibilité de la méthode de détection avant de pouvoir réaliser des essais chez l'homme.

-Réduire : L'expérience comprend 4 lots d'animaux. Parmi les 3 lots infectés, nous testerons 2 souches de *E. coli* adhérentes et invasives issues de patients et une souche de *E. coli* non pathogène. Le dernier lot est non-infecté. Pour chaque animal, nous pourrons réaliser 5 expériences en duplicat sur les fèces et 5 expériences en duplicat sur l'intestin. Le nombre d'animaux a été réduit au minimum dans la mesure où cela ne compromet pas les objectifs du projet. Cette expérience comporte 5 animaux par lot, ce qui permettra d'obtenir des résultats fiables, reproductibles et statistiquement significatifs.

-Raffiner : Les animaux seront disposés dans des cages de 450 cm² (5 animaux par cage) et auront libre accès à l'eau et la nourriture. Les conditions d'hébergement sont les suivantes : température 20-24°C, hygrométrie 50 plus ou moins 10%, cycle 12h/12h, éclairage 350/450 lux. Une période d'acclimatation sera réalisée avant le début de la procédure (une semaine). Un enrichissement est proposé aux souris : lamelles de cartons compressées et maisonnettes.

-Une légère diarrhée est attendue en réponse à l'infection bactérienne mais la courte durée de la période d'infection (24 heures) limite le développement de symptômes de colite. Les animaux sont surveillés étroitement tout signe de souffrance. Si un animal remplit des critères préalables définis (points limites), il sera immédiatement sorti du protocole. Le responsable du projet décidera de la mise à mort.

14665 L'obésité est un problème de santé publique majeur qui est associé à de nombreuses pathologies tel que le diabète de type II, les maladies cardiovasculaires, l'hypertension artérielle, le cancer. Il est nécessaire de trouver des traitements pour réguler la prise de poids chez ces patients et ainsi réduire le risque de mortalité. Dans ce contexte nous souhaitons tester deux molécules (que nous ne pouvons pas explicitement nommer pour des raisons de confidentialité) dans un modèle de souris "High Fat Diet".

Dans cette saisine, la règle des 3R a été suivie comme suit

- Remplacer Des études *in vitro* ont montré que les adipocytes expriment la molécule d'intérêt et lors du développement de l'obésité cette molécule est plus exprimée (Carrière et al, International journal of obesity, 2017). Cependant pour pouvoir tester le rôle de l'anticorps dirigé contre cette molécule nous ne pouvons pas utiliser des modèles *in vitro* qui ne permettent pas de tester les interactions entre les différents types cellulaires présents *in vivo*.

- Réduire Le nombre d'animaux par procédure est réduit à 200, nombre nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. Les souris seront divisées en 4 groupes (50 souris/groupe). Le nombre de groupe a été réfléchi de manière à avoir les contrôles suffisants pour pouvoir conclure quant aux résultats obtenus.

-Raffiner Les souris seront pesées 2 fois par semaine et seront surveillées tous les jours. Les animaux montrant des signes physiques caractéristiques d'un mal être (cf fichier annexe) seront euthanasiés. Les conditions d'hébergement et d'enrichissement sont standards à l'espèce, les souris seront par groupe social de 5 maximum par cage, avec des moyens d'enrichissement (des tunnels, et paper wool).

Durant le protocole, les animaux seront suivis pour leur poids. Via des prélèvements sanguins effectués tous les 15 jours nous évaluerons la tolérance au glucose, le taux d'insuline ainsi que d'autres marqueurs sériques.

Tous les animaux traités et ceux des groupes contrôles seront analysés à la fin du protocole afin d'en obtenir un maximum d'information post mortem (analyse cellulaire par cytométrie, immunohistologie, analyse d'expression ARN).

Les résultats obtenus permettront de déterminer le potentiel thérapeutique de nos anticorps pour traiter l'obésité.

14666 Notre projet porte sur la mise en évidence d'anomalies du développement périnatal des neurones moteurs de la moelle épinière de la souris SOD1G93A, modèle murin de la maladie sclérose latérale amyotrophique (SLA). La SLA ou maladie de Charcot est une maladie caractérisée par une dégénérescence des neurones moteurs qui survient pendant la vie adulte et qui conduit à une paralysie fatale. La plupart des études se sont focalisées sur les périodes symptomatiques ou pré-symptomatiques et non sur les mécanismes initiaux conduisant fort probablement à la survenue de la maladie. Notre projet est basé sur nos résultats montrant que le développement des inhibitions est affecté chez la souris SOD1G93A. Nous proposons d'agir pendant la vie fœtale sur les mécanismes impliqués dans la mise en place des inhibitions afin de tester si cela a une répercussion sur la survenue de la maladie lors de la vie adulte.

Un développement anormal des inhibitions pourrait avoir des conséquences tardives conduisant à la dégénérescence des neurones moteurs pendant la vie adulte et à la paralysie fatale chez les patients SLA. Notre programme est un premier pas vers de nouvelles stratégies de recherche qui seront essentielles pour diagnostiquer la SLA à des stades précoces.

D'un point de vue méthodologique, nous nous engageons à respecter au maximum la règle des 3 R (remplacement, réduction, raffinement) :

- Remplacement : des expériences de simulations informatiques sont réalisées afin de remplacer/compléter certaines expériences. Cela permet de remplacer l'utilisation des souris et de réduire le nombre d'animaux.

- Réduction : afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, notre projet basé sur des méthodes variées permet d'utiliser au maximum tous les embryons et animaux néonataux disponibles issus d'une portée. Concernant les expériences réalisées chez l'adulte, un nombre minimum d'animaux est programmé en accord avec les tests statistiques qui seront réalisés à posteriori.

- Raffinement : les souris sont élevées avec un enrichissement. Des points limites (annexe 2) sont établis afin de réduire au maximum la souffrance des animaux liée à leur incapacité à se nourrir en fin de vie.

Dans son ensemble, notre projet est basé sur l'utilisation de 1898 animaux sur 5 années de recherche.

14667 Le choc septique (défaillance multi-viscérale survenant au cours d'une infection grave associée à un syndrome de réponse inflammatoire systémique ou SIRS) est un problème de santé publique majeur dont l'incidence augmente avec le vieillissement de la population et dont la mortalité est comprise entre 30 et 70% (selon les études). Malheureusement, à ce jour, il n'existe pas de traitement adapté au choc septique ou au SIRS, conduisant à la mort de plus de 45 000 personnes par an en France. Il devient donc urgent de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Nous avons développé une approche visant à stimuler l'O-GlcNAcylation dans le choc septique. L'O-GlcNAcylation est une modification protéique responsable de la survie cellulaire qui joue un rôle majeur dans la réponse au stress. Les approches développées sont associées à une réduction importante des marqueurs de stress, à une amélioration de la fonction cardiovasculaire et une forte réduction de la mortalité dans le modèle de choc septique. La limitation actuelle repose sur les molécules pharmacologiques disponibles qui sont peu stables et qui présentent des effets indésirables importants. Nous proposons dans ce projet de tester de nouvelles molécules développées répondant à cette problématique. Le modèle animal de choc septique le plus adapté ici est le modèle par ligature ponction-caecale (LPC) chez le rat. Cela permet de générer un choc avec la symptomatologie du choc septique (SIRS, défaillance métabolique multiviscérale) de manière simple, très reproductible et dans une cinétique bien connue et maîtrisée dans notre laboratoire. De plus la reproductibilité de ce modèle permet un criblage des molécules efficaces. Les expérimentations sont conçues afin de respecter la règle des 3R réduire le nombre d'animaux utilisés au minimum tout en ayant des données statistiques assez puissantes (dans la mesure du

possible les tests seront réalisés en aveugle, afin d'augmenter la puissance de l'étude) qui ne nécessiteront pas l'utilisation de nouveaux animaux et l'utilisation des animaux est justifié uniquement car le modèle n'est pas remplaçable. Les différentes procédures expérimentales de la première étape (mise au point) seront réalisées sur des effectifs réduits afin de déterminer les conditions d'utilisation optimales. Dans un second temps, lorsque les conditions d'utilisation optimales auront été déterminées, les procédures seront réalisées sur un plus grand nombre d'animaux avec seulement les conditions sélectionnées dans la première étape. Afin de raffiner le modèle, des mesures seront mises en place afin de maximiser le confort des animaux par exemple avec la mise en place de scores et de points limites comprenant des critères morphologiques (aspect, comportement) et physiologiques (température, fréquence respiratoire), l'administration d'un antidouleur en début de procédure et à 8 heures post-chirurgie est prévue et la réinjection d'une dose supplémentaire peut être considérée en cas de signe de douleur. Enfin plusieurs investigations seront réalisées sur les mêmes animaux, afin de limiter la multiplication de groupes expérimentaux et d'animaux nécessaires. Tout au long de l'étude, les animaux seront hébergés par 2 ou 3 (selon le poids des animaux), dans des cages avec enrichissement, sur portoirs ventilés et avec accès à l'eau et à la nourriture ad libitum. Après chirurgie, afin d'éviter au maximum le stress des animaux mais aussi afin d'éviter que les animaux s'abiment les zones suturées, les animaux seront placés dans des cages individuellement. Un respect strict des cycles jour/nuit sera observé. Au total, le projet devrait intégrer 650 animaux au maximum, répartis entre les différents groupes nécessaires à l'étude la mise au point du modèle animal et des différentes procédures expérimentales maximum de 26 rats, l'évaluation de nos traitements *in vivo* et l'établissement d'une bio-collection maximum de 624 rats. L'ensemble des détails sur le nombre d'animaux est récapitulé dans un tableau fourni en annexe.

Le nombre d'animaux pour l'étude des traitements est calculé de la façon suivante un nombre d'animaux statistiquement viable est sélectionné ($n=15$). A cela s'ajoute la mortalité associée au modèle (environ 30%) mais également l'exclusion de certains animaux (environ 40% avec les résultats précédemment obtenus) soit $15 \times 70\% = 10,5$ soit 11 animaux soit un total de $15+11 = 26$ animaux.

Pour l'étude des traitements, 3 molécules différentes seront testées (ces trois traitements sont trois molécules ayant la même cible mais chimiquement différent). Pour le premier traitement, 5 cinétiques de traitement et 5 doses d'administration seront évaluées, soit 10 conditions pour la condition « LPC+TRAITEMENT1 » soit $26 \times 10 = 260$ animaux. A cela s'ajoute les 26 animaux des conditions « CTRL » et « LPC » soit $2 \times 26 = 52$. Soit un total de 312 animaux.

Pour la seconde et la troisième molécule, seules 2 doses et 2 cinétiques (celles étant jugées les plus pertinentes à la vue des résultats du premier traitement) seront testées, soit $4 \times 26 = 104$ pour le groupe « LPC+TRAITEMENT2 » (ou « LPC+TRAITEMENT3 ») auxquels s'ajoutent les animaux des groupes « CTRL » et « LPC » soit 26 animaux par groupe soit 52 animaux. Ainsi, 156 animaux seront utilisés pour l'étude de la seconde molécule (traitement 2) mais également de la troisième molécule (traitement 3).

14668 Le lupus systémique érythémateux (LES) est une maladie chronique rare qui se manifeste par des symptômes variables pouvant atteindre plusieurs organes (peau, articulations, reins, système nerveux central, séreuses...). La maladie survient dans 90% des cas chez la femme et débute le plus souvent à partir de la puberté. En France, la prévalence de la maladie est de 41 cas sur 100 000 et l'incidence de 3-4 nouveaux cas par an sur 100 000 habitants. Elle est caractérisée par des lésions parfois irréversibles ou mortelles. A ce jour, il n'existe aucun traitement curatif.

A l'heure actuelle, il existe un besoin crucial d'explorer le système immunitaire et plus exactement mieux comprendre les mécanismes moléculaires, cellulaires et environnementaux qui régissent la réponse immunitaire dans le contexte du LES dans le but d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pouvant améliorer la prise en charge des patients.

Des données de publications *in vitro* récentes pointent une cible moléculaire qui pourrait être un acteur essentiel de la maladie. Pour étudier le rôle de cette cible dans la pathologie, un modèle de

souris a été développé dans le laboratoire mimant le développement de cette pathologie. En parallèle, nous avons menés des études *in vitro* pour développer un inhibiteur de cette cible. Nous nous proposons donc maintenant de valider nos études *in vitro* par une étude *in vivo* avec cette inhibiteur sur notre modèle de souris mimant le développement du lupus.

Dans le respect des règles des 3R,

Réduire Pour nos expériences, nous avons prévu le nombre nécessaire et suffisant d'animaux, pour garder une puissance statistique dans le traitement des résultats et avoir le nombre de contrôles internes obligatoires, pour prouver l'efficacité des molécules thérapeutiques utilisées.

Raffinement Afin de respecter la notion de raffinement, et éliminer ou réduire toute douleur, souffrance, angoisse, ou tout dommage durable, susceptible d'être infligé aux animaux, leur bien-être et leur souffrance seront pris en compte quotidiennement de leur naissance à leur mort et évalués par le personnel zootechnique expérimenté. Ainsi, pour chaque procédure impliquant une douleur supérieure à celle d'une piqûre, les animaux seront anesthésiés. De plus, chaque cage (type 2L avec 5 souris par cage) recevra du matériel pour nidifier dans le but de rétablir le répertoire comportemental des souris.

Remplacer Des méthodologies de culture cellulaire et de modélisation *in vitro* ont été mises en place afin de remplacer au possible l'utilisation d'animaux pour répondre à certaines questions spécifiques à ce projet. Cependant seul un modèle *in vivo* chez la souris récapitulant les éléments de la physiopathologie du lupus et regroupant les multiples acteurs de l'immunité innée/adaptative observés chez l'homme, permettra de vérifier l'hypothèse sur l'implication des enzymes OGT/GFAT/PGM3 et OGA sur le développement du LES.

Afin de réaliser l'ensemble de nos expériences, 815 souris sont demandées sur une période de 3 ans.

14669 *Pseudomonas aeruginosa* (PA) est une bactérie responsable d'infections pulmonaires graves chez les patients atteints de mucoviscidose. L'implantation de PA est souvent favorisée par le Virus Respiratoire Syncytial (VRS). Au vu de l'émergence rapide de résistance aux antibiotiques et du manque d'antiviraux, il est capital de rechercher des alternatives thérapeutiques comme les probiotiques. Les probiotiques, parmi lesquels certaines souches de *Lactobacillus*, sont des microorganismes qui, administrés en quantités adéquates, confèrent un bénéfice à la santé de l'hôte.

Lors d'une étude princeps, un criblage bactérien réalisé à partir de 137 souches de lactobacille, toutes issues de patients atteints de mucoviscidose, a permis d'identifier 2 souches pour leur forte activité anti-PA. Nous avons mis en évidence que ces deux bactéries (*L. salivarius* et *L. brevis*), administrées préventivement dans un modèle murin C57BL/6 d'infection pulmonaire à *P. aeruginosa*, possédaient un effet anti-PA significatif très intéressant.

Nous avons également mis en évidence que la viabilité des lactobacilles était indispensable à leur activité anti-PA et que le mode d'instillation nasal permettait de lutter plus efficacement contre PA au niveau pulmonaire par rapport à une administration orale.

Au vu de ces premières étapes importantes menées avec succès, que sont l'identification des souches de *Lactobacillus* à fort potentiel anti-PA et leurs mécanismes d'actions, les investigations nécessitent d'être poursuivies dans un nouveau modèle murin BABL/c spécifique du VRS. Compte tenu du fait que les infections virales au VRS favorisent la survenue d'infections bactériennes à PA, nos expérimentations s'inscrivent dans un nouveau projet qui aura pour but d'évaluer l'effet de l'administration intranasale de *Lactobacillus* en prophylaxie sur deux modèles mono-infectieux de pneumonie aiguë à Virus Respiratoire Syncytial (VRS) d'une part et à *P. aeruginosa* (PA) d'autre part, puis dans un 2ème temps sur un modèle de co-infection VRS-PA (modèle mimant la cinétique infectieuse observée chez les patients CF). Les expérimentations menées avec le VRS seront effectuées par nos collaborateurs qui ont l'expérience de ce pathogène et du modèle murin spécifique à ce dernier. Seul le modèle mono-infectieux de pneumonie aiguë à PA (objet de cette DAP) sera expérimenté par notre équipe.

Nous utiliserons 42 souris BALB/c, afin de mener à bien ces expérimentations.

Nous analyserons la quantité de *P. aeruginosa* dans le poumon 24 heures après l'instillation du pathogène. Des dosages de molécules immunitaires pulmonaires et sanguins seront réalisés 24 heures après l'infection à *P. aeruginosa*. Des analyses du microbiote pulmonaire et digestif de ces souris seront également menées afin de définir les mécanismes d'action de ces *Lactobacillus*.

L'ensemble de ce projet respecte les principes de remplacement, réduction et raffinement. En effet les *Lactobacillus* ont été sélectionnés *in vitro* dans un premier temps (principe de remplacement), le nombre d'animaux a également été réduit au maximum sans compromettre les objectifs du projet (principe de réduction). Les animaux sont élevés à l'animalerie dans des cages enrichies avec un igloo et de la litière cellulose au sein d'un portoir ventilé et les procédures expérimentales utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible la douleur et/ou l'angoisse des animaux (anesthésie préalable des animaux avant toutes procédures expérimentales ainsi que l'utilisation de lampes chauffantes durant toute la durée de la procédure) (principe de raffinement).

14670 L'enseignement de la physiologie animale se décline sous différentes Unités d'Enseignement (UE) au cours d'une licence "Sciences de la Vie". Les étudiants suivent un parcours avec une spécialisation progressive qui leur permet d'acquérir des compétences nécessaires notamment pour la poursuite de leurs études au sein des Masters. Cette demande concerne donc des UE spécifiquement orientées vers des étudiants se spécialisant dans le domaine de la physiologie animale, pour lesquelles le recours à des animaux vivants est nécessaire de manière à mettre en évidence des mécanismes à l'échelle d'un organisme, ce qui est le propre de la physiologie.

Les procédures présentées ici concernent des travaux pratiques destinés à une UE de L2 et une UE de L3, qui seront suivies, sur une période de 5 ans par au moins 1255 étudiants, avec les fluctuations annuelles dues au fait que l'UE proposée en L3 est un enseignement optionnel. Le nombre total d'animaux utilisés sur la période de 5 ans est estimé à 790. Parmi ces 790 souris, seules 685 seront soumises à des procédures.

Les enseignants impliqués dans ces séances de travaux pratiques sont tous formés avec un niveau "concepteur-réalisateur" et sont également formateurs dans deux formations continues agréées par la CNEA et le ministère de l'Agriculture. Le nombre d'animaux utilisé est réduit au minimum tout en garantissant que les objectifs pédagogiques soient atteints et certains animaux sont réutilisés dans le cadre de travaux pratiques qui ne sont pas soumis à une demande d'autorisation de projet car ils n'impliquent aucune procédure. Lorsque des procédures sont susceptibles de provoquer une douleur chez l'animal, des traitements analgésiques appropriés sont mis en oeuvre ainsi qu'une surveillance adaptée.

14671 Dans les pays développés, la consommation spontanée en protéines est élevée (au moins égale à 1,4 g / kg / j) et riche en protéines animales (environ 70%). L'élévation du niveau de vie dans les pays en voie de développement conduit à une augmentation de la consommation de protéines, et notamment de protéines animales (par exemple en Asie, la part des protéines animales est passée de 15 à 40%). Avec l'augmentation de la population mondiale et, on peut l'espérer, la poursuite du développement économique, la demande en protéines animales va donc augmenter. Or, étant donné la disponibilité non infinie des surfaces agricoles, et les problèmes de pollution liés à l'élevage des animaux, en particulier dans les systèmes intensifs, il ne sera pas possible, de façon durable, de satisfaire les besoins en protéines animales de la population mondiale en 2050. Il est nécessaire (et conseillé par les nutritionnistes) de réduire notre consommation de protéines animales, et d'augmenter la part des protéines végétales (à hauteur de 50%). Classiquement, étant donné les carences relatives en acides aminés indispensables des protéines végétales, il est nécessaire d'associer plusieurs sources pour reconstituer un apport adéquat en acides aminés indispensables (souvent, céréales et légumineuses). L'objectif de ce projet est d'aller un peu plus loin et 1) de mettre au point un mélange de protéines végétales purifiées de haute qualité nutritionnelle, particulièrement riche en acides aminés clés, et 2) d'utiliser des sources végétales encore peu valorisées actuellement. En choisissant avec soin les sources de ces protéines, les méthodes de purification, et les proportions, il devrait être possible d'obtenir un mélange qui couvre tous les

besoins en acides aminés, mais apporte également des quantités accrues de leucine, cystéine et arginine, ce qui en ferait une source protéique particulièrement adaptée pour lutter contre les effets du vieillissement, ou d'une alimentation trop riche en énergie (gras, sucre) en effet, une forte disponibilité en ces trois acides aminés permet de lutter contre la perte de muscle, l'inflammation, les maladies cardiovasculaires. L'expérience qui doit être réalisée chez le rat a pour but de vérifier les qualités du mélange de protéines végétales obtenu.

Ainsi nous comparerons ces protéines végétales à des protéines laitières chez des rats en vieillissement nourris soit avec un régime standard, soit avec un régime riche en gras et en sucre. Nous vérifierons alors les effets à long terme de ces régimes sur l'évolution de la masse maigre et de la masse musculaire (dans une période où elle diminue spontanément chez le rat), et sur des paramètres indicateurs du stress oxydant, de l'inflammation, et de la santé cardiovasculaire (ces paramètres sont souvent altérés avec l'âge, ou en réponse à un régime gras et sucré). En outre, nous vérifierons le coefficient d'efficacité protéique et la digestibilité du mélange de protéines végétales par rapport à une protéine de référence chez de jeunes rats en croissance. Nous pourrions ainsi finalement savoir si le mélange de protéines végétales choisi permet effectivement de faire mieux ou aussi bien que les protéines laitières.

Pour réaliser cette expérience, nous utiliserons 34 jeunes rats au sevrage (appétence, digestibilité des régimes), et 96 rats âgés de 15 mois (préservation de la masse musculaire et de la santé cardiovasculaire). Les dispositions prises pour l'application de la règle des 3R sont les suivantes

« Remplacer » Un premier tri des différentes possibilités de mélanges de protéines végétales sera réalisé grâce à un digesteur *in vitro*. Seul le mélange le plus digestible sera finalement testé chez l'animal. La digestibilité chez l'animal sera cependant vérifiée, et rapportée à la croissance des animaux, ce qui est impossible à faire *in vitro*, et permettra d'évaluer l'efficacité des protéines végétales. En ce qui concerne le vieillissement et la perte de masse musculaire, aucun modèle *in vitro* ne peut remplacer l'expérimentation chez le rat âgé.

« Réduire » Nous avons prévu le nombre d'animaux nécessaire pour répondre aux différentes questions scientifiques à la fois pour garder une bonne puissance statistique, et pour tenir compte des pertes d'animaux, en particulier chez les rats en vieillissement pour lesquels la mortalité spontanée augmente naturellement avec l'âge. En outre, toutes les précautions sont prises pour ne pas démarrer le protocole tant que nous n'avons pas la certitude de pouvoir le mener à bien jusqu'au bout (appétence pour les régimes, puis mesure de la digestibilité, puis étude sur le vieillissement).

« Raffiner » Les animaux seront suivis quotidiennement de façon à identifier rapidement des signes éventuels de souffrance (état du pelage, comportement des rats, cris, mobilité, alimentation, poids). En cas d'apparition d'un point limite notable ou grave, une observation plus poussée de l'animal sera faite et le tableau d'observation des points limites sera renseigné. Si 3 points limites notables ou 1 point limite grave sont observés, nous utiliserons l'arbre décisionnel, en discussion avec le personnel de l'animalerie, afin de décider si l'animal doit être euthanasié. Les études menées chez les rats au sevrage sont à très court terme, chez des animaux en pleine croissance, à même de supporter des cages individuelles peu confortables. Pour les études chez les rats en vieillissement, les animaux seront hébergés par paires, dans des cages confortables, et enrichies (balle inox ou tubes).

14672 Comprendre les bases neuronales de la prise de décision dans un milieu réaliste, c'est-à-dire changeant et dynamique, est un enjeu majeur pour les neurosciences cognitives, ces capacités étant typiquement altérées dans nombre de pathologies mentales comme la Schizophrénie. La littérature récente indique clairement que des régions cérébrales dites corticales (le cortex orbitofrontal) et sous-corticales (des régions thalamiques) jouent un rôle essentiel dans ce processus. L'objectif de ce projet d'une durée prévue de 4 ans (494 rats) est de mieux comprendre le rôle fonctionnel des connexions anatomiques entre régions corticales et thalamiques. Pour cela, nous proposons une approche de neuroanatomie descriptive (traçage de voies anatomiques) et trois approches de neuroanatomie fonctionnelle (approche lésionnelle, pharmacogénétique et optogénétique) chez le Rat.

L'approche d'anatomie descriptive est nécessaire pour raffiner les interventions qui seront employées dans le projet et consiste à identifier les connexions nerveuses qui existent entre les neurones corticaux et les neurones thalamiques. Les interventions visent à manipuler l'activité de ces régions corticales et thalamiques pour mieux comprendre leurs fonctions. Trois approches complémentaires sont planifiées. D'abord une approche lésionnelle classique permettra initialement de valider une épreuve comportementale visant à solliciter la capacité à prendre une décision adaptée dans un milieu incertain. Ensuite des approches pharmacogénétiques et optogénétiques complémentaires permettront de comprendre le rôle des différentes voies anatomiques identifiées dans l'approche descriptive dans ces processus. Ces approches reposent sur la modification de l'activité nerveuse des neurones soit par une molécule exogène (une substance pharmacologique, approche pharmacogénétique), soit par une stimulation lumineuse au niveau intra-cranien (approche optogénétique).

Le projet porte un soin particulier au respect de la règle des 3Rs. Le recours à l'animal est imposé par la nature même du projet étudier les bases neurales de la prise de décision, qui peut se faire chez le rongeur dont le système nerveux central présente des caractéristiques proches de celles de l'homme. Nous avons choisi de recourir le plus largement possible à des interventions réversibles afin de limiter le nombre d'animaux nécessaires (plusieurs interventions peuvent être faites sur le même individu). Par ailleurs, les données comportementales étant essentielles, s'assurer du bien-être des animaux est un pré-requis absolu pour la bonne marche du projet. Un enrichissement du milieu est prodigué aux animaux (deux individus par cage, présence de nid, tunnel et bâton à ronger). Des points limites associés à des actions sont identifiés pour le cas où les mesures de prises en charge de la douleur et de l'inconfort pouvant résulter de l'étape chirurgicale ne seraient pas suffisantes.

14673 Le codage de l'information sonore est fortement tributaire de la mise en place au cours du développement de circuits neuronaux le long de la voie auditive. Ainsi, toute atteinte des structures auditives (périphérique ou centrale) est responsable de déficits auditifs et peut conduire à une modification du comportement général de l'animal. L'objectif principal est de déterminer si une alération génétique chez la souris entraînant une surdité peut induire aussi des modifications comportementales et dans quelles mesures.

Dans ce projet, nous cherchons à définir un phénotype comportementale particulier lié à la perte auditive de type sensorielle causée par une transmission anormale des sons le long des voies auditives centrales. En particulier, nous souhaitons éclaircir les modifications comportementales liées aux déficiences auditives de type génétique, telles que celles dues à la perte de fonction du gène *Hoxb1* chez la souris et à des mutations faux sens du gène *HOXB1* chez l'homme.

Pour cela, nous envisageons une approche purement comportementale par une succession de tests classique de phénotypage lié à la locomotion, à la mémoire, la dépression et l'anxiété chez des souris KO pour le gène *Hoxb1*.

Nos procédures expérimentales incluent des croisements de souris génétiquement modifiées afin de générer la population et se limitent au stade adulte. Les dommages causés aux animaux seront limités dans la mesure où il s'agit de tests comportementaux non invasifs, à durée très courte où les animaux sont libres de leurs mouvements.

Nous utilisons des procédures expérimentales qui minimisent la douleur et la détresse des animaux. La qualité de la contention et la sûreté des gestes seront assurés par des utilisateurs compétents et formés, ce qui limitera le stress imposé à l'animal par les procédures.

Les procédures sont mises en œuvre en utilisant systématiquement des critères d'arrêt précoce et des points limites adaptés à chaque procédure et modèle génétique. Comme mesures de Raffinement de l'expérimentation, le bon état ou la souffrance des animaux seront observés selon des grilles d'évaluations adaptées aux procédures. De plus, les tests comportementaux seront enregistrés par un système d'analyse vidéo non invasif. Les animaux seront hébergés dans les conditions habituelles d'animalerie avec un environnement enrichi en accord avec la réglementation en vigueur. Nous sélectionnerons par génotypage les sourceaux déficients pour *Hoxb1* à la

naissance et réduisons la portée pour permettre aux souriceaux mutants plus faibles de bien se nourrir auprès de la mère. En outre, au sevrage une nourriture énergétique et gélatifiée sera ajoutée dans la cage pour optimiser la prise alimentaire. Dans un souci de Réduction, le nombre d'animaux pour chaque expérience sera limité à celui nécessaire à la validation d'un effet significatif. Nous utilisons une stratégie de croisement qui permet d'utiliser tous les animaux homozygotes générés, et les mêmes animaux seront utilisés dans tous les tests comportementaux. La sélection des animaux par génotypage des souriceaux permettra en outre de réduire le nombre d'animaux utilisés et d'obtenir des données suffisantes pour répondre à nos questions scientifiques, sans compromettre le bien-être animal (Réduction). Au niveau du Remplacement il n'existe malheureusement pas de modèles d'études intégrées comme la mémoire, l'anxiété ou la dépression aussi fines que chez la souris. L'analyse comportementale sera faite par un système d'analyse vidéo automatique afin d'avoir un bon niveau de raffinement des résultats et de permettre d'utiliser un nombre minimal d'animaux (90) car absence de besoin de refaire les tests (Réduction).

14674 La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est une maladie de la rétine provoquée par une dégénérescence progressive de la macula, partie centrale de la rétine, qui apparaît le plus souvent à partir de 65 ans. En France, environ 1,5 millions de personnes seraient atteintes de DMLA. C'est la principale cause de cécité non corrigeable chez les personnes âgées dans les pays industrialisés. Les causes précises de cette maladie ne sont pas connues et les mécanismes peu compris. Il s'agit d'une maladie polygénique et multifactorielle des facteurs génétiques prédisposant y occupent une place privilégiée au côté des facteurs environnementaux. Il existe deux formes de DMLA atrophique et exsudative. La forme atrophique ou « sèche » est essentiellement caractérisée par une dégénérescence rétinienne responsable de la perte de vision irréversible. La forme exsudative (ou "humide") correspond à l'apparition de nouveaux vaisseaux sanguins au niveau de la choroïde qui, à terme, peuvent provoquer des hémorragies sous-rétiennes et accélérer l'évolution vers la cécité. Les traitements existants permettent seulement de ralentir l'évolution de la formation et la croissance de nouveaux vaisseaux et donc uniquement la forme humide de la pathologie alors qu'aucun traitement n'est disponible pour la forme sèche de la DMLA. Invariablement, dans les 2 formes de la pathologie, un processus inflammatoire est présent caractérisé par l'infiltration et l'accumulation de cellules inflammatoires participant de manière importante à la dégénérescence de la rétine. Il est nécessaire aujourd'hui d'une meilleure compréhension de ces mécanismes inflammatoires pour enfin trouver de nouvelles cibles thérapeutiques. Pour trouver de nouveaux traitements efficaces et préventifs, nous devons comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires de la DMLA.

Parmi les facteurs génétiques il a été démontré un lien entre des variants du gène HTRA1 sur le chromosome 10 humain et l'augmentation de la prédisposition. De précédentes analyses de cohorte de patients ainsi que de nos nombreux travaux antérieurs sur modèles murins ou cellulaires, nous ont permis d'établir un lien entre la surexpression du gène HTRA1 et l'induction de l'ostéopontine (OPN). L'ostéopontine est une protéine qui assure diverses fonctions biologiques. Elle est impliquée dans des processus physiologiques mais aussi dans la pathogenèse de divers états pathologiques dont l'inflammation. Le but de cette étude est d'évaluer les effets du manque d'ostéopontine dans nos modèles murins d'inflammation sous rétinienne, dégénérescences rétinienne, et de néovascularisation choroïdienne avec ou sans addition de molécule modulant l'inflammation, de mieux comprendre son implication dans la DMLA, et peut être de mettre en évidence une piste thérapeutique. L'utilisation de l'animal est indispensable dans ce projet comme expliqué plus haut, la DMLA est le résultat d'une interaction complexe entre différents types cellulaires et ne peut être complètement modélisée par des modèles cellulaires *in vitro*. Conformément à la « règle des 3R » décrite au 2° de l'article R214-105, nous avons limité au maximum le nombre d'animaux nécessaires pour obtenir des résultats statistiquement interprétables. Les animaux seront examinés quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié de l'animalerie et seront hébergés dans les conditions conformes à la réglementation. Pour éviter toute souffrance animale, les animaux bénéficieront d'une anesthésie générale.

Un total de 1428 souris sera nécessaire.

14675 Les tumeurs cérébrales (TC) sont des tumeurs très agressives pour lesquelles le traitement de référence est la chirurgie, associée à la radiothérapie (RT) et la chimiothérapie. Pour les TC inopérables, la RT est la référence. Les progrès réalisés dans la prise en charge des patients atteints de TC ont permis une augmentation substantielle de la survie des patients. Néanmoins, ces patients se plaignent de déficits cognitifs majeurs pendant la phase de traitement et à plus long terme lors de la phase de rémission, ce qui impacte directement leur qualité de vie. Les mécanismes sous-jacents aux effets de la RT sur la cognition ne sont pas bien connus. Ainsi, il est nécessaire d'étudier les effets de la RT sur le tissu cérébral afin de proposer à ces patients un moyen de récupérer les fonctions cognitives affectées par le cancer et ses traitements ainsi qu'aborder la récupération « après-cancer » pour améliorer leur qualité de vie.

Le projet proposé a pour but d'évaluer chez le primate non-humain d'une part, les effets de l'irradiation sur la structure et la fonction du cerveau, par des approches d'imagerie IRM, et sur les fonctions cognitives, par des analyses comportementales, et d'autre part, l'impact de l'activité physique, comme outil thérapeutique potentiel, sur ces paramètres. Les rares études sur le sujet disponible sont réalisées sur des modèles rongeur ce qui présente certaines limites, d'où l'intérêt de cette étude basée sur un modèle de primate.

Des retombées majeures sont attendues avec ce projet puisqu'il devrait mettre en évidence, pour la première fois chez le marmouset, les dommages cérébraux radio-induits et leurs conséquences sur la cognition. De plus, l'intérêt thérapeutique de l'activité physique sur la récupération neurologique, pourrait être ensuite évalué en clinique.

Cette étude sera réalisée en suivant le principe des 3R (Raffiner, Réduire, Remplacer). Raffiner les animaux seront hébergés aux normes requises et le milieu sera enrichi le personnel participant au projet est formé et les inspections du bien-être des animaux seront réalisées quotidiennement. De plus, toutes les mesures visant à réduire la douleur, la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux seront entreprises, notamment en appliquant une anesthésie et une analgésie appropriées. Réduire grâce à l'utilisation au préalable de tests statistiques appropriés et à l'utilisation de techniques d'investigation non invasives (imagerie IRM, tests comportementaux), le nombre d'animaux nécessaire pour permettre une puissance des résultats sera réduit au minimum. Remplacer le primate non-humain, grâce à sa proximité à l'Homme, représente le modèle de choix pour étudier, avec une perspective translationnelle, les effets de l'irradiation sur le cerveau et sur les performances cognitives.

Le nombre estimé d'animaux utilisés est de 40 marmousets d'élevage répartis en 4 groupes.

14676 Les opiacés sont les traitements les plus utilisés pour lutter contre la douleur en médecine moderne. Cependant leur utilisation prolongée peut s'associer à des phénomènes de tolérance vis-à-vis de leurs effets antalgiques, et à l'émergence d'une dépendance physique voire d'une véritable addiction chez certains individus vulnérables. Nous faisons l'hypothèse que ces propriétés tant bénéfiques que délétères des opiacés dépendent des modifications de l'expression des gènes qu'ils induisent en tissu cérébral. A leur tour, ces modifications sont contrôlées par des mécanismes épigénétiques qui représentent une forme de plasticité génomique à long terme, qui pourrait permettre d'expliquer comment l'exposition aux opiacés perturbe le fonctionnement cérébral sur de très longues périodes, notamment chez les sujets ayant développé une addiction. Nous explorerons l'hypothèse que ces modifications moléculaires survenant au sein du tissu cérébral lors de l'exposition à des opiacés, pourraient induire ou être accompagnées par des modifications moléculaires similaires survenant dans des tissus périphériques. Alors que le tissu cérébral n'est pas accessible pour des études moléculaires chez des sujets humains, cette approche pourrait permettre d'identifier des biomarqueurs permettant de suivre, en situation clinique, les effets des opiacés à partir de prélèvements de tissus tels que le sang ou la salive. Dans ce contexte, nous proposons une étude pour caractériser chez l'animal les modifications génomiques et épigénétiques qui surviennent lors d'une exposition aux opiacés. Le projet nécessitera l'utilisation d'un total de 1560 souris. Il sera conduit en respectant la règle des 3R (remplacer – réduire – raffiner) visant à remplacer ou réduire chaque fois que possible le nombre d'animaux, ainsi qu'à optimiser les procédures. "Remplacer" les effets moléculaires des opiacés, sur le cerveau et d'autres tissus de

l'organisme, ne peuvent pas être étudiés en utilisant des modèles cellulaires, qui par nature ne récapitulent ni la complexité de l'organisation cérébrale en réseaux complexes de structures interconnectées, ni les communications inter-tissulaires. L'étude de ces effets nécessite donc l'analyse d'organismes vivants et entiers. "Réduire" les animaux utilisés étant consanguins, la variabilité phénotypique est limitée, ce qui permet de réduire le nombre d'animaux tout en mettant potentiellement en évidence un effet statistiquement significatif. Ainsi, au regard des données de la littérature et de la variabilité interindividuelle attendue, les groupes expérimentaux destinés à caractériser les comportements liés aux effets de récompense ou aux effets aversifs des opiacés seront constitués de 15 souris chacun (par sexe). "Raffiner" nous avons choisi d'utiliser des protocoles expérimentaux qui minimisent au maximum l'inconfort des animaux tout en permettant néanmoins d'étudier les propriétés aversives des opiacés. Les conditions d'hébergement sont optimisées en fonction des comportements naturels des rongeurs les souris sont hébergées en groupe sociaux de 3 à 5 animaux par cage, et chaque cage est enrichie avec un barreau à ronger et des papiers absorbants pour faire un nid. Enfin, lors de la réalisation de procédures chirurgicales les animaux reçoivent un traitement antidouleur (anesthésique local autour du site de chirurgie et traitement par un anti-inflammatoire non stéroïdien).

14677 Détecter précocement les phases de décompensation de l'insuffisance cardiaque est un enjeu de santé publique majeur. Nous proposons une approche originale qui consiste à implanter par voie endoscopique, dans la zone de la paroi gastrique, le plus proche possible du cœur, un dispositif miniaturisé capable de recueillir des grandeurs physiques caractérisant l'activité cardiorespiratoire, et de les transmettre à une station de recueil capable de les interpréter. Ce dispositif est destiné, à terme, à anticiper chez des patients insuffisants cardiaques, les phases aiguës de décompensation pour permettre aux cliniciens d'adapter très rapidement leurs conduites thérapeutiques.

Un premier prototype analogique filaire implanté chirurgicalement par gastrostomie chez l'animal anesthésié, a apporté la preuve de concept et démontré notre capacité à détecter les signaux d'intérêt dans des conditions optimales d'acquisition.

Suite à ces résultats préliminaires, un nouveau dispositif numérique a été développé, intégrant la possibilité de transmettre sans fil les paramètres recueillis, permettant à terme l'acquisition de données sur plusieurs jours en conditions ambulatoires.

L'objectif principal de cette nouvelle étude est d'étudier l'influence de l'axe électrique du cœur sur la qualité de l'ECG capturé par des électrodes placées au niveau gastrique. Un dispositif expérimental permettant la mesure d'un ECG avec deux électrodes en faisant varier leur position grâce à une matrice a été mis au point. Ce dispositif va permettre d'évaluer l'impact de l'orientation des électrodes par rapport à l'axe électrique du cœur sur la qualité du signal obtenu, en réalisant plusieurs mesures ECG sur la face interne de l'estomac à partir de différents couples d'électrodes orientés différemment.

L'étude sera réalisée sur des porcs, en raison des nombreuses similitudes anatomiques et physiologiques avec l'homme.

Un maximum de 3 animaux sera utilisé pour couvrir l'ensemble des objectifs du projet.

Ce nombre a été réduit au minimum afin de respecter la règle des 3 R sans que cela ne puisse compromettre la mise au point de la procédure chirurgicale et les conclusions du projet sur l'impact de l'orientation des électrodes sur la qualité du signal ECG recueilli.

Il n'existe pas d'alternative à l'expérimentation animale pour développer et valider ce type de dispositif destiné à la mesure de paramètres physiologiques *in vivo* chez l'homme.

Le bien-être des animaux est respecté par une manipulation de sujets habitués à l'homme et la réalisation d'une anesthésie profonde dans les règles de l'art durant tout le temps opératoire. Les animaux sont mis à mort sans risque de réveil dès la fin des actes chirurgicaux.

De plus, afin de réduire le recours à l'animal, nous réalisons post-mortem des prélèvements de tissus-organe-bloc multi tissulaire, à destination de recherche et d'enseignement.

14678 Bien que très réglementée, l'utilisation de composés organophosphorés (OP) est courante dans l'agriculture où sont utilisés des pesticides tels que le chlorpyrifos. L'incidence d'intoxication passive, active ou accidentelle avec des pesticides OP est associée à près de 300 000 décès annuels dans le monde pour près de 3 millions de cas d'intoxication reportés. Plus inquiétant, l'utilisation en 2017 d'armes de guerres neurotoxiques contenant des OP (Sarin en Syrie et VX en Malaisie), démontre une menace toujours actuelle pour les populations civile et militaire. Sur le plan physiopathologique, l'intoxication aiguë aux OP entraîne l'inhibition irréversible des cholinestérases augmentant la concentration d'acétylcholine dans l'ensemble de l'organisme ce qui conduit à une hyperactivité du système nerveux central (SNC) qui peut engendrer des œdèmes cérébraux, de la neurodégénérescence et des crises épileptiques voir la mort. Si le traitement d'urgence permet de stabiliser les victimes, son efficacité au niveau du SNC est limitée. De plus certaines victimes peuvent être exposées à de faibles doses d'OP sans présenter des symptômes. Très peu d'études se sont intéressées aux effets des faibles doses sur le système neurovasculaire. Ainsi, il paraît indispensable d'améliorer nos connaissances afin de caractériser les perturbations de l'unité neurovasculaire (UNV) à court et moyen terme pouvant survenir après une exposition à une faible dose d'OP afin de développer de nouvelles stratégies diagnostiques et thérapeutiques plus efficaces.

Les objectifs du projet sont 1/ de caractériser les altérations à courts et moyens termes du système neuro-vasculaire suite à une exposition aux OP 2/ d'identifier des cibles moléculaires et cellulaires pour développer de nouvelles techniques de détection des atteintes cérébrales et 3/ Mettre au point et évaluer l'efficacité de nouvelles stratégies neuroprotectrices lors d'intoxication aux OP.

Pour cela un analogue du sarin manipulable en laboratoire standard (le Nitrophényl Isopropyl MethylPhosponate ou NIMP) sera administré à des souris SWISS mâles, souris C57BL6 tPA wild-type et tPA null de 8-10 semaines. Les animaux feront l'objet d'un suivi de 6 mois à l'aide de techniques d'imagerie non invasives permettant d'étudier l'UNV. Ainsi pour mener à bien ce projet, un nombre total 1288 souris sera nécessaire ce nombre comprend 874 souris SWISS wild-type, 207 souris C57BL6 tPA wild-type et 207 souris C57BL6 tPA null.

Cette étude prend en compte le bien-être animal et les pratiques éthiques, et répond à la règle des 3 Rs. L'ensemble des connaissances et des acquis dont nous disposons dans la littérature font de la souris le modèle préférentiel pour mener à bien ce projet. Cette partie du projet ne peut faire l'objet de remplacement par d'autres modèles alternatifs.

Pour éviter de stresser les animaux, les cages seront isolées de tout bruit extérieur et l'accès à l'eau et à la nourriture sera ad libitum. Une importance particulière sera apportée au bien-être des animaux. Tout sera mis en œuvre pour réduire l'angoisse, la souffrance et la douleur de chaque animal, pouvant être occasionnées pendant le projet. Enfin, les expériences seront réalisées par du personnel qualifié en respectant les règles de bonnes pratiques de laboratoire pour le respect des animaux, tout en veillant à ne pas dépasser les points limites fixés au préalable. Le bien-être des animaux sera suivi quotidiennement par du personnel qualifié pendant toute la durée du projet. Les animaux seront hébergés dans des cages standards répondant aux normes européennes actuelles. Pour éviter de stresser les animaux, les cages seront isolées de tout bruit extérieur et l'accès à l'eau et à la nourriture sera ad libitum. Les principes éthiques et les standards de raffinement seront utilisés jusqu'à la mise à mort de l'animal.

14679 La mammite, inflammation de la glande mammaire, résulte principalement d'une infection bactérienne. Elle représente l'une des raisons les plus fréquentes de recours à l'antibiothérapie chez la vache laitière. Dans le but d'améliorer les résistances naturelles des vaches aux infections de la mamelle et de diminuer les phases morbides qui en résultent, il devient essentiel de développer de nouvelles stratégies pour lutter contre ces infections. Cela permettra ainsi de diminuer l'utilisation des antibiotiques et de fournir aux consommateurs des produits plus sûrs et plus naturels. Plusieurs études ont déjà rapporté les effets bénéfiques des β -glucanes (BG) de levure sur la santé dont l'amélioration de la résistance individuelle aux infections de façon non spécifique, les capacités de régénération tissulaire ou encore l'immunité, principalement la sécrétion de médiateurs immunitaires et les fonctions phagocytaires. Le terme « éducation immunitaire » a d'ailleurs été suggéré chez l'homme pour définir l'état renforcé des réponses immunitaires innées

induites lors d'une infection secondaire. Cet état immunitaire renforcé est généré lors d'une exposition ponctuelle de l'animal à des beta-glucanes de levure en amont de l'infection.

Ainsi, le présent projet vise à

(i) Mettre au point des outils *ex vivo* de caractérisation de l'éducation immunitaire chez la vache laitière

(ii) D'apporter la preuve de concept d'une éducation immunitaire chez la vache laitière en transition recevant des pailles de levures enrichies en BG.

(iii) D'évaluer la durée de cette éducation immunitaire en début de lactation

Afin de répondre à nos objectifs, des bovins adultes ($n = 20$) seront supplémentés oralement en en beta-glucane de levure 3 à 4 semaines pré-partum. Des prélèvements de sang sont faits avant et après vêlage et utilisés pour l'isolement des cellules mononucléaires périphériques sanguines (PBMC) permettant ainsi la récolte des monocytes. Ces derniers pourront être infectés par d'un LPS (lipopolysaccharides) ou non afin de mimer un challenge infectieux. Ce modèle infectieux permettra de remplacer l'infection directe chez l'animal, de réutiliser les animaux après l'expérience et de limiter la douleur chez l'animal par le fait de faire une prise de sang. Le point limite identifié étant le refus catégorique de l'animal pour la prise de sang, il est prévu de contenir l'animal avec un licol ou aux cornadis pour faciliter de prélèvement mettant ainsi l'animal dans de meilleures prédispositions.

14680 Les maladies auto-immunes sont dues à des défauts du système immunitaire conduisant ce dernier à s'attaquer aux composants normaux de l'organisme (le "soi"). Les maladies auto-immunes sont devenues la 3^e cause de mortalité dans les pays industrialisés après le cancer et les maladies cardiovasculaires. Elles touchent environ 8% de la population dans ces pays dont 78% de femmes. Parmi ces maladies peuvent être citées le lupus, la sclérose en plaques, le diabète de type 1, la polyarthrite rhumatoïde, le syndrome de Sjögren (SjS), la maladie de Crohn, etc. On distingue classiquement les maladies auto-immunes spécifiques d'un organe, où les attaques du système immunitaire sont limitées à un organe particulier (par exemple, thyroïdites auto-immunes), et les maladies auto-immunes systémiques, telles que le lupus systémique érythémateux (SLE), qui atteignent plusieurs organes.

Certaines de ces pathologies, notamment le lupus et le syndrome de Sjögren peuvent être très hétérogènes dans leur présentation, dans leur impact sur la qualité de vie et la survie des patients et dans leur réponse aux traitements.

Malgré l'évolution des traitements et l'apparition de nouvelles modalités thérapeutiques ces dernières années (anticorps monoclonaux), les maladies auto-immunes et notamment les formes les plus sévères, sont encore mal prises en charge. En effet, de nombreux patients ne répondent à aucun des traitements disponibles ou souffrent des effets secondaires importants des thérapies les plus courantes (corticostéroïdes, etc.). Il existe donc un réel besoin de thérapies innovantes dans ces pathologies.

De nombreux essais cliniques ont échoué ces dernières années dans différentes pathologies auto-immunes. Une des hypothèses est que ces pathologies sont trop hétérogènes pour pouvoir observer les effets bénéfiques d'un traitement dans un essai clinique incluant les patients uniquement sur la base de leur diagnostic clinique. Il semble donc urgent de mieux comprendre ces pathologies, leur hétérogénéité et les éventuels biomarqueurs associés à chaque sous-groupe pour permettre une meilleure stratification des patients dans de futurs essais et adapter les traitements à chaque population.

Le but des études proposées ici est donc double

- mieux comprendre la physiopathologie des maladies auto-immunes, notamment SLE et SjS, pour identifier des cibles thérapeutiques innovantes. Une fois les cibles identifiées et validées, utiliser les modèles *in vivo* décrits ici pour évaluer des candidats médicaments contre ces cibles.

- Identifier et évaluer la pertinence de biomarqueurs identifiés dans ces modèles ou dans des cohortes de patients, pour permettre une meilleure stratification des patients et adapter les traitements à chaque population.

Les études incluses dans ce projet incluent des observations cliniques, éventuellement des traitements par des médicaments, et des prélèvements sanguins pour dosage de biomarqueurs et des taux de médicaments dans le sang. Les administrations/prélèvements sanguins sont adaptés en termes de volume et de fréquence conformément à la réglementation et réalisés avec les méthodes les moins contraignantes possibles (par exemple prélèvement par microsampling).

Les objectifs sont en conformité avec le principe des 3R (remplacer, réduire, raffiner). S'il n'est pas possible de remplacer complètement l'usage du modèle animal (organisme entier complexe), des méthodes alternatives *in vitro* et *in silico* sont utilisées au préalable dans la sélection des modèles et des molécules dans les stades précoces du développement.

Dans ce projet il est prévu d'utiliser au maximum 1440 souris sur une durée de 5 ans. Le nombre de rongeurs utilisé est calculé en fonction de la variabilité des paramètres examinés.

Le degré de sévérité de ces études ne doit pas dépasser le stade modéré des grilles de points-limites sont appliquées, sous contrôle d'un vétérinaire, afin de prendre des décisions rapidement chaque fois que cela s'avère nécessaire et éviter toute souffrance inutile.

Ce projet permettra de valider de nouvelles cibles thérapeutiques et biomarqueurs dans des modèles murins de pathologies auto-immunes et permettra par la suite de développer des candidats médicaments pour des pathologies humaines graves et répandues

14681 La régénération osseuse nécessite après une fracture le recrutement d'ostéoblastes pour former un nouveau tissu osseux et réparer la lésion traumatique.

Une des approches utilisées est l'implantation de matrices qui contiennent des cellules souches mésenchymateuses (MSCs) pour induire la régénération osseuse. Cependant, les MSCs implantées dans ces matrices meurent rapidement après implantation.

Notre projet vise à développer une matrice de collagène dans laquelle seront encapsulées des MSCs transfectées avec des formulation ARN permettant l'expression de facteurs ostéogènes pendant une durée de temps compatible avec le processus de régénération osseuse, c'est-à-dire 10-15 jours. Plus précisément, l'objet de cette étude est de déterminer la meilleure combinaison matrice de collagène/formulation/ARN permettant la plus longue expression des transgènes *in vivo*.

Les dommages attendus pour les animaux sont mineurs et éventuellement liés à l'implantation des matrices de collagène sous la peau. Nous estimons avoir recours à 95 souris. Nos travaux seront menés dans le respect de la règle des 3R l'effectif des souris mis en œuvre est limité au strict minimum permettant d'obtenir des résultats exploitables statistiquement. Les explorations seront menées par imagerie de bioluminescence *in vivo*, non invasive, qui permet de réduire la souffrance (Raffiner). Les examens d'imagerie pourront être répétés pour le même animal à différents temps (Réduire). L'utilisation des modèles cellulaires a déjà été réalisée mais ils ne reflètent pas le fonctionnement d'un organisme complet (absence de vascularisation, d'organes). C'est pour cette raison que l'utilisation de modèle animaux est indispensable pour vérifier la capacité du protocole proposé à exprimer le transgène à long terme dans une matrice. Etant donné la complexité des processus mis en jeu, aucune méthode de remplacement fiable n'est disponible (Remplacement).

14682 Objectifs du projet

Notre équipe étudie les bases moléculaires du développement précoce du système nerveux. Spécifiquement nous étudions la survie et la prolifération de précurseurs neuronaux dans le cerveau antérieur et le cervelet chez le Xénope, en particulier une voie de signalisation connue pour son rôle dans la promotion de la prolifération des cellules cibles. Comprendre comment la pluripotence et l'auto-renouvellement des cellules souches sont maintenus grâce à cette voie est un enjeu de recherche fondamentale majeur et permettra aussi d'aider à comprendre l'émergence de cancers pédiatriques, dont certains sont issus de la prolifération erratique des cellules souches/progénitrices. L'étude des mécanismes est possible dans des œufs de Xénope fécondés *in vitro*, qui sont analysés ensuite à des stades embryonnaires précoces et jusqu'au stade 48 pour couvrir les étapes précoces du développement du cervelet dans cette espèce.

Avantages et dommages escomptés

Les amphibiens *Xenopus laevis* et *Xenopus tropicalis* sont des organismes modèles pour l'étude des processus développementaux chez les vertébrés. Les études réalisées à partir de ce modèle permettent de mieux comprendre les processus développementaux des modèles mammaliens dont l'homme. L'analyse du génome de *Xenopus* montre d'importantes similitudes avec le génome humain, notamment 79% des gènes identifiés dans des maladies humaines ont leur équivalent chez le xénope. L'utilisation de ce modèle permet d'associer aux approches d'embryologie classique, de biochimie et de biologie cellulaire, des études à large échelle de l'expression des gènes et des analyses pharmacologiques.

Nombre et types d'animaux à utiliser sur 5 ans.

Afin d'obtenir les embryons nécessaires à nos expérimentations, nous prévoyons d'utiliser 3-4 xénopes femelles par semaine. Les animaux utilisés seront ensuite mis au repos durant 4 mois. Ainsi, durant les 5 années du projet, nous anticipons d'utiliser au maximum 60 xénopes *laevis* et 20 xénopes *tropicalis* femelles sauvages adultes qui seront périodiquement stimulées par injection d'hormone selon les protocoles standard.

Conformité avec les exigences 3R

Le vertébré tétrapode non mammifère *Xenopus laevis* et *Xenopus tropicalis* répondent idéalement aux recommandations des 3R Remplacer, Réduire et Raffiner. Le choix du modèle, et des pratiques expérimentales reposent sur les propriétés suivantes

- Notre projet explore des étapes du développement qui ne pourraient pas être abordées aussi efficacement et simplement dans un modèle mammifère.
- Nous utilisons au maximum des approches *in silico* et si possibles des approches dans des cellules mammifères en culture.
- Un grand nombre d'embryons (plusieurs milliers) sont obtenus par fécondation *in vitro* à partir d'un nombre limité d'individus adultes, permettant à plusieurs expérimentateurs de travailler simultanément,
- Une estimation de la variabilité inter-individuelle naturelle (animaux sauvages non sélectionnés) et une analyse statistique immédiate des résultats obtenus. Le développement externe des embryons permet une observation non-invasive.
- Toutes nos expériences sont restreintes aux stades embryonnaires antérieurs à la forme larvaire autonome.
- L'amphibien *Xenopus laevis* et *Xenopus tropicalis* possèdent une longévité et une période de reproduction remarquables (15 ans) ce qui en fait un excellent modèle pérenne pour les études d'ordre génétique.
- Les femelles utilisées dans les expériences impliquant une fécondation *in vitro* peuvent être induites à pondre plusieurs fois en respectant un intervalle de 4 mois entre chaque ponte, minimisant le stress potentiellement engendré.
- Nous procédons à une veille bibliographique régulière et la validation du résultat est faite par analyses statistiques permettant de calculer au plus près le nombre d'animaux nécessaires à notre projet.

Toutes ces caractéristiques minimisent significativement le nombre d'animaux nécessaires au projet, sans compromettre ses objectifs scientifiques.

- 14683** Nos projets sont principalement axés sur l'étude des mécanismes moléculaires qui contrôlent le développement des cellules gliales dans le système nerveux central des vertébrés. La compréhension de ces mécanismes représente un enjeu majeur qui pourrait avoir un impact important dans le cadre de nouvelles approches thérapeutiques. En effet, la découverte de la persistance de cellules gliales immatures dans le cerveau adulte des mammifères, en mettant en évidence la présence d'un réservoir de cellules capables de régénérer les tissus lésés, offre de

nombreux espoirs basés sur la perspective de traitements visant à stimuler la réparation des lésions du système nerveux.

Nos objectifs sont d'identifier et d'élucider la fonction de nouveaux gènes impliqués dans le développement glial et de caractériser la diversité des lignages gliaux. Aucune expérience effectuée sur des cellules en culture ne peut remplacer les observations réalisées sur les embryons ou sur les animaux adultes. En effet, afin d'avoir une meilleure compréhension de l'origine et de la diversité des cellules gliales, nous introduisons des mutations génétiques ciblées ou des gènes rapporteurs dans la souris qui nous permettent d'étudier le développement et la différenciation de ces cellules dans le contexte de l'embryon entier ou du système nerveux du jeune adulte.

Nos travaux antérieurs nous ont amené à identifier trois nouveaux gènes *sulf1* et *sulf2* qui codent pour des enzymes extracellulaires et le gène *phf3* qui code pour une protéine nucléaire. L'étude phénotypique d'embryons mutants pour *sulf1* ou *sulf2* nous a permis de montrer que la perte de fonction de ces gènes affecte le développement de sous-populations de cellules gliales, validant le rôle majeur de ces enzymes dans le contrôle de la gliogenèse. Toutefois, de nombreuses questions restent ouvertes sur le mode d'action de ces enzymes, en particulier, la sous-population des progéniteurs neuraux dont l'engagement vers un destin glial est affecté dans les mutants *sulf1* et *sulf2* reste à définir. Pour répondre à cette question, nous proposons de développer une approche de perte de fonction conditionnelle qui permettra de cibler la perte de fonction de *sulf1* ou *sulf2* dans un sous-type de progéniteurs neuraux. Par ailleurs, nous nous intéressons au gène *phf3* dont l'expression spatio-temporelle dans l'embryon de souris est corrélée avec les étapes précoces du développement glial. Cependant, nous n'avons pas encore d'évidence fonctionnelle sur son implication dans le contrôle du développement glial. Deux lignées mutantes ont récemment été générées au laboratoire. Ces lignées seront utilisées pour générer des individus mutants et différents marqueurs des cellules gliales immatures et différenciées seront utilisés pour évaluer les conséquences de la perte de fonction de PHF3 sur la gliogenèse.

Nous avons récemment identifié une nouvelle population de cellules gliales immatures dans le système nerveux embryonnaire de souris. De manière particulièrement intéressante, nos résultats récents indiquent que l'émergence de ces cellules est contrôlée par la protéine *Sulf2*. L'objectif sera ici de déterminer la carte d'identité génique de cette nouvelle sous-population gliale, une ressource indispensable pour définir leur spécificité par rapport aux autres populations gliales ainsi que leur potentielle spécificité fonctionnelle.

Dans son ensemble, ce projet est basé sur l'utilisation de 536 souris réparties sur 9 lignées murines distinctes (2 lignées knock-out conditionnelles, 1 lignée knock-in, 2 lignées knock-out et 4 lignées rapportrices). Les individus génétiquement modifiés seront comparés aux individus sauvages (au moins 4 individus par génotype et par marqueur). Les individus dont le génotype n'est pas intéressant pour le protocole seront sacrifiés après sevrage. Ces individus représentent en moyenne le double du nombre des individus expérimentaux.

Tous les animaux sont hébergés selon les normes d'éthique en vigueur et disposent d'enrichissement lors de la stabulation. Afin d'assurer un suivi optimal du bien-être animal, une surveillance quotidienne sera effectuée de manière à identifier d'éventuels signes comportementaux (diminution du comportement exploratoire, prostration, baisse de la reproduction) ou une détérioration de l'aspect extérieur (plaie apparente, perte de poids, poil hérissé, dos vouté). Tous les animaux dont l'état sanitaire se dégrade seront euthanasiés.

14684 Le cervelet joue un rôle central dans l'apprentissage et dans l'exécution de mouvements coordonnés et rapides. Le cadre général de nos recherches vise à relier les propriétés élémentaires du réseau neuronal du cervelet à cette fonction. La simplicité apparente de sa structure fait du cervelet un très bon modèle pour les tentatives d'établir le lien entre le fonctionnement neuronal et le comportement. Nous allons caractériser les entrées excitatrices et inhibitrices des cellules de Purkinje (qui est centrale dans le réseau du cervelet) puis étudier comment ces entrées se combinent pour générer l'activité en sortie de la cellule et obtenir des données qui faciliteront l'interprétation des enregistrements *in vivo*.

Les méthodes principales mises en oeuvre dans notre projet sont l'enregistrement électrophysiologique et optique de neurones dans des tranches de cervelet de souris, afin de pouvoir bénéficier des approches génétiques. Les enregistrements se font dans le but de « cartographier » les connexions synaptiques entre les types cellulaires différentes, de caractériser leurs propriétés moyennes mais également les variations internes aux classes de synapses et de neurones.

Le nombre de souris reflète le besoin d'établir robustement nos conclusions, afin d'éviter tout gaspillage engendré par la non répliquabilité des statistiques faites avec une faible puissance. Viser des conclusions robustes et éviter le gaspillage réduit au minimum le nombre d'animaux utilisés. S'agissant d'exploration du réseau de neurones in situ, qui résulte du développement en trois dimensions et de l'histoire de vie de l'animal par le biais de l'apprentissage, le remplacement de l'expérimentation animale n'est pas envisageable. Le principe de raffinement des expériences est observé en évitant toute souffrance des animaux : ils sont hébergés en groupes, permettant l'interaction sociale, dans un environnement enrichi par l'introduction d'un mouchoir papier dans la cage; l'unique procédure (sans réveil) se fait sous anesthésie profonde.

L'utilisation de 250 souris de type sauvage en totale pendant 5 ans est prévue.

14685 Les maladies inflammatoires métaboliques comme le diabète de type-2 et l'obésité sont généralement associées à des changements dans l'équilibre énergétique de l'organisme. Ce changement consiste en un déséquilibre entre la consommation et la dépense calorique, ce phénomène conduit à une accumulation excessive et ectopique des lipides. L'accumulation anormale de lipides est connue pour induire un stress inflammatoire qui contribue au développement de l'insulino-résistance dans d'autres tissus, pour induire l'épuisement des cellules productrices d'insuline (cellules bêta du pancréas) et pour conduire au développement du diabète de type 2. Il est bien établi aujourd'hui que l'inflammation joue un rôle clé dans la mise en place du diabète, de la dyslipidémie associée et des complications vasculaires et hépatiques du diabète. Deux gènes régulateurs de l'inflammation et qui ont une forte implication dans le développement du diabète de type-2 ont été identifiés. Cependant les interactions entre l'inflammation et le déséquilibre énergétique de l'organisme, qui conduit à une déposition ectopique des lipides, restent peu connus.

Par ce projet nous souhaitons évaluer les rôles de ces deux gènes dans le déséquilibre bioénergétique des souris au cours du développement de l'insulino-résistance sous un régime riche en graisse. Pour ce faire, nous allons mettre des souris invalidées pour ces deux gènes dans les macrophages (cellules de l'immunité innée) sous un régime riche en graisse et nous allons analyser la dépense énergétique, la locomotion et le comportement alimentaire des souris d'une façon non-invasive. De plus nous allons évaluer l'efficacité de l'adaptation énergétique au changement de température chez les souris invalidées pour nos gènes d'intérêt dans les macrophages (cellules de l'immunité innée). Ces critères seront analysés par calorimétrie indirecte dans des cages dites métaboliques. Ces cages sont équipées pour mesurer les échanges gazeux, la locomotion et le comportement alimentaire, de plus nous pouvons moduler la température ambiante entre 4°C et 30°C pour évaluer la capacité thermogénique et adaptative de la souris.

La recherche animale est indispensable pour ces études. Avec l'avantage des mesures indirectes aucun geste invasif n'est fait sur les souris. Cela nous aidera à déchiffrer les acteurs et les mécanismes pathologiques et thérapeutiques dans le diabète. La stratégie des 3R (réduire, raffiner, remplacer) sera respectée, par exemple pour les études cellulaires nous allons remplacer les modèles murins par l'utilisation de lignées cellulaires, les mêmes souris seront utilisées pour plusieurs projets d'équipe afin de réduire le nombre total de souris en expérimentation. Pour les études de variation de température ambiante, nous avons défini une séquence de variation qui permet l'utilisation de la même souris pour deux critères d'évaluation (1/ adaptation à la thermoneutralité puis 2/ capacité thermogénique ces deux évaluations sont décrites en détails dans les procédures expérimentales de cette demande d'autorisation). Les animaux sont acclimatés à l'animalerie et sont habitués à être manipulés avec un suivi de poids hebdomadaire qui permet, en plus des données expérimentales, de s'assurer du bon état de santé des animaux.

Nombre d'animaux utilisé : 500 souris (20 souris par groupe, génotype et par condition expérimentale)

14686 - Le projet actuel rentre dans le cadre d'une recherche principalement préclinique avec une partie dédiée à la recherche fondamentale. Cette étude se déroulera principalement autour de trois axes de recherche l'épilepsie, la fonction respiratoire et la sérotonine (plus spécifiquement le récepteur sérotoninergique 2C).

- La Mort Soudaine Inattendue en Epilepsie (MSIE) est une issue qui touche chaque année 0,5% des patients épileptiques. La MSIE a souvent lieu après une crise épileptique induisant une longue pause/arrêt respiratoire défini comme une « apnée » et qui aboutit à l'arrêt cardiaque puis au décès du patient. Une étude menée en post-mortem chez des victimes de MSIE a montrée une altération du système sérotoninergique. La sérotonine est un neurotransmetteur libéré dans le cerveau et fortement impliqué dans la régulation des neurones responsables du contrôle de la respiration et qui sont situés dans la partie postérieure du cerveau appelée tronc cérébral. Il n'existe à ce jour aucun marqueur biologique fiable qui permet de prédire la MSIE chez le patient épileptique, ce qui limite les études qui pourraient être menées chez l'homme et qui permettraient de comprendre les mécanismes physiopathologiques impliqués dans ce type de décès. Ainsi et dans le cadre de la prévention contre la MSIE, il est aujourd'hui primordial d'identifier les mécanismes neurobiologiques qui sont impliqués dans la survenue du dysfonctionnement respiratoire lié à l'épilepsie, en ayant recours aux modèles expérimentaux chez l'animal.

- Pour cette étude, notre choix s'est porté sur le modèle d'épilepsie induit par la pilocarpine chez le rat. Ce choix de modèle est justifié par les caractéristiques communes qui existent entre le modèle d'épilepsie chez le rat et celle de l'épilepsie chez l'homme qui sont détaillées ci-après

1- La présence de crises épileptiques après l'induction d'un status epilepticus (une longue crise épileptique) par la pilocarpine.

2- La présence chez 40% des rats épileptiques d'altérations de la fonction respiratoire.

3- Le groupe de rats épileptiques qui souffre d'altérations respiratoires présente comme chez le patient épileptique, des altérations du système sérotoninergique. Parmi l'ensemble des altérations 5-HTergique qui sont associés aux altérations respiratoires chez le rat épileptique, seule celle du récepteur sérotoninergique 2C (5-HT_{2c}) se maintient au cours du temps suggérant la possibilité de l'implication de ce récepteur dans l'apparition du dysfonctionnement respiratoire.

4- Par les similitudes anatomiques que possède le cerveau du rat avec celui de l'homme, nous souhaitons enregistrer en simultané la fonction respiratoire et l'activité électroencéphalographie dans l'hippocampe qui est une région présentant communément une activité cérébrale altérée lors de l'épilepsie.

5- L'absence de mortalité liée aux troubles respiratoires est également un grand avantage dans le modèle de rat pilocarpine. Cela permettra de vérifier si le récepteur 5-HT_{2c} est impliqué dans la résistance des rats épileptiques à la mortalité et le cas échéant envisager ce récepteur comme cible thérapeutique pour prévenir la MSIE chez le patient épileptique.

Dans ce projet nous souhaitons caractériser le rôle fonctionnel du récepteur 5-HT_{2c}R et son implication dans la survenue des altérations respiratoires liées à l'épilepsie. Il comportera deux procédures expérimentales afin de répondre à deux objectifs principaux

(1) Caractériser les populations cellulaires sujettes aux variations d'expression du récepteur 5-HT_{2c}R dans le tronc cérébral de rats épileptiques présentant des altérations respiratoires.

(2) Identifier par une approche pharmacologique, utilisant un agoniste et un antagoniste spécifique du récepteur 5-HT_{2c}, le rôle fonctionnel joué par ce récepteur dans la présence des altérations respiratoires chez les rats épileptiques ainsi que leurs résistances à la mortalité.

A l'issue de ce projet et compte tenu des caractéristiques physiologiques et neurobiologiques communes entre le modèle de rat pilocarpine et le patient épileptique victime de MSIE, nous pourrons mieux comprendre le rôle de ce récepteur dans la survenue d'altérations respiratoires liées à l'épilepsie et les mécanismes qui seraient impliqués dans la résistance à la mortalité. Le cas

échéant, ce récepteur pourrait constituer une cible pharmacologique pertinente pour prévenir la MSIE.

Notre engagement vis à vis des exigences des 3 R

Remplacement l'enregistrement simultané intra-hippocampique et l'utilisation d'un protocole d'administration de plusieurs substances pharmacologiques rendent ces expériences non envisageables chez le sujet humain. L'étude des rythmes cérébraux et respiratoires au cours ou en dehors d'une crise épileptique nécessitent l'utilisation d'animaux vivants et ne peut s'envisager sur des modèles *in vitro*. Le rat est aujourd'hui la seule espèce dans laquelle ont été caractérisés des troubles respiratoires associés à de l'épilepsie.

Réduction du nombre d'animaux pour mener ce projet, nous aurons besoin d'utiliser 320 rats pendant une durée de 3 ans. Ce nombre a été réduit au minimum en nous basant sur les données bibliographiques antérieures et permettant de réaliser des analyses statistiques.

Raffinement Nous avons choisi d'enregistrer la respiration de façon non-invasive en utilisant une cage de pléthysmographie. L'induction de l'épilepsie par la pilocarpine est une procédure sévère nécessitant un suivi accru de l'état général des animaux en se référant à une grille de score établie pour déterminer le degré de souffrance des animaux. La procédure d'enregistrement électro-encéphalographie nécessite l'implantation chirurgicale d'électrode dans le cerveau. Cet acte de chirurgie sera réalisé sous anesthésie et analgésie. En post-chirurgie, les rats seront surveillés pluri-quotidiennement jusqu'à récupération, en se référant à la grille de scores établis pour définir l'état de souffrance des animaux. Toutes les mesures seront donc prises pour limiter la souffrance et la douleur des animaux. L'expérience sera stoppée si les points limites qui sont clairement définies dans la grille de score sont atteints. A la fin de chaque procédure expérimentale, les rats sédatisés seront mis à mort.

- 14687** Les traitements anticancéreux traditionnels (radiothérapie, chirurgie et chimiothérapie) détruisent soit les cellules cancéreuses soit les cellules saines et ils ne préviennent pas du risque de récurrence. Depuis quelques années nous travaillons sur la capacité des certaines chimiothérapies (anthracyclines ou oxaliplatine) à activer le système immunitaire grâce à l'induction de la mort cellulaire. Une étude clinique rétrospective nous a permis d'identifier deux polymorphismes affectant 2 gènes, impliqués dans l'efficacité de la chimiothérapie. Ces pertes de fonction sont associées à une plus faible survie chez des patients atteints de cancer du sein, recevant des anthracyclines. Le but de ce projet est d'étudier dans le détail le rôle du système immunitaire en cas de compensation des effets provoqués par l'absence des gènes. Cette question ne peut être abordée qu'*in vivo* car il n'est pas possible d'étudier l'implication du système immunitaire sur le contrôle de la croissance tumorale dans des systèmes *in vitro*. Nous souhaiterons effectuer cette étude en utilisant des souris immunocompétentes (n. 690), des souris transgéniques (n. 690) et des souris immunodéficientes (n. 360) accessibles dans le commerce et qui sont viables, fertiles, de taille normale et ne présentent pas d'anomalies physiques ou comportementales. Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des expérimentations (expériences de croissance tumorale) a été mis au point afin de respecter les exigences de remplacement, réduction et raffinement pour permettre une interprétation fiable des résultats dans le respect du bien-être animal. Les expérimentations seront regroupées au maximum afin de réduire le nombre d'animaux contrôles. L'étude sera arrêtée si la procédure initiale invalide l'hypothèse de travail. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et adaptées en accord avec le personnel de l'animalerie (les animaux disposent de nourriture et d'eau *ad libitum*; le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification et/ou tunnels en cartons). Les animaux seront observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être. La mise en place d'une grille de suivi strict des points limites permettra d'éviter au maximum le stress et/ou la douleur au cours de l'expérimentation. De plus, le personnel impliqué dans ce projet est qualifié sur le plan technique et formé en continu sur les pratiques d'expérimentation animale. Il assure également une veille scientifique continue, évitant toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature.

14688 Les maladies neurodégénératives sont une préoccupation croissante en santé publique. Malgré d'importants efforts de recherche, il n'existe encore aujourd'hui aucun traitement capable de combattre de façon efficace la progression de ces maladies.

Des nouvelles approches thérapeutiques sont essentielles pour progresser dans la prise en charge des patients. Parmi ces nouvelles approches thérapeutiques prometteuses se trouvent la thérapie génique. Elle utilise l'ADN pour soigner ou prévenir la maladie. Selon la pathologie, cet objectif peut être atteint en délivrant aux cellules un gène à action thérapeutique (transgène) qui surexprime la protéine déficiente dans la maladie. Ces acides nucléiques sont le plus souvent transportés dans les cellules grâce à un vecteur viral.

Nous avons déjà la preuve de concept de notre stratégie dans des modèles murins pour les maladies neurodégénératives suivantes :

- La maladie d'Alzheimer la surexpression de l'enzyme clé du métabolisme cérébral du cholestérol à l'aide d'un vecteur (de type AAV) dans les régions précocement atteintes par la pathologie chez des souris modèles (amyloïde et tau) permet de restaurer les déficits mnésiques.

- L'Ataxie spinocérébelleuse de type 3 et la maladie de Huntington : La surexpression de cette même enzyme à l'aide d'un vecteur AAV permet de corriger les anomalies neuropathologiques et comportementales chez les souris modèles.

Nous avons récemment identifié un nouveau vecteur viral qui passe efficacement la barrière hématoencéphalique et permettra ainsi de prévenir une approche invasive d'injection intracérébrale remplacée par une injection intraveineuse. Nous avons aussi identifié différents promoteurs qui envisagent un ciblage spécifique de différents types cellulaires du système nerveux central. Le but final de l'étude est donc 1) d'établir la preuve de concept de l'injection intraveineuse de ce vecteur couplé aux différents promoteurs dans des souris normales et de 2) comparer cette voie d'administration intraveineuse à l'injection intracérébrale (nombre de copies du vecteur, niveaux de protéine et tolérance) dans des souris saines avant de tester chez la souris modèle.

Remplacement : Le recours aux modèles animaux est essentiel, car aucun type de culture cellulaire ou système synthétique ne permet à ce jour de reproduire la complexité architecturale des cellules du cerveau en particulier leurs interactions structurelles et fonctionnelles. De plus, nous avons déjà utilisé des souris sauvages pour mettre au point des protocoles. Les animaux utilisés dans le cadre de ce projet sont nés et élevés en captivité dans des élevages agréés.

Réduction : Enfin, le nombre d'animaux utilisés est optimisé pour obtenir des résultats statistiques. Leur nombre (230) a été restreint au minimum indispensable de façon à obtenir des données nécessaires pour valider l'efficacité d'une stratégie thérapeutique innovante qui peut être considérée comme cible dans plusieurs maladies neurodégénératives. En effet, des travaux précédents ont permis d'établir les doses de vecteurs à injecter et les temps d'analyses.

Raffinement : Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. L'application de critères d'arrêts standards en élevage/utilisation, et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe certifient le bien-être des animaux. De plus, en cas d'observation de la moindre douleur, les souris recevront un traitement analgésique et anti-inflammatoire, et si cette douleur devait persister, les animaux seraient euthanasiés pour éviter toute souffrance.

14689 L'encéphalopathie anoxo-ischémique néonatale (EAI) est la conséquence d'un défaut aigu d'oxygène survenant au cours de l'accouchement. Elle concerne 1 à 5 enfants/1000 naissances. Dans sa forme sévère, elle peut conduire au décès ou entraîner des séquelles neurologiques graves à long terme (25 %). Les mécanismes physiopathologiques sont complexes et peuvent entraîner une mort cellulaire en particulier des neurones. La thérapie actuelle reposant sur une hypothermie globale est insuffisante et de nombreuses études sont en cours pour définir une thérapie optimale. L'EAI entraînant des mécanismes physiopathologiques complexes, l'utilisation d'un modèle murin reste indispensable car il permet d'appréhender les altérations survenant dans l'ensemble de l'organisme (Remplacement). Le modèle le plus utilisé est un modèle dit d'hypoxie-ischémie cérébrale (HIC) ou modèle de Rice-Vanucci. Ce modèle consiste à reproduire le manque d'apport d'oxygène au cerveau, qu'il peut y avoir au moment de l'accouchement, en faisant une ligature

d'une artère carotide (diminution de l'apport sanguin) suivie d'une hypoxie (placement des animaux dans un environnement pauvre en oxygène). Tout ceci se fait sous anesthésie générale/analgésie chez des rats nouveau-nés de 7 jours. C'est le modèle murin d'EAI néonatale de référence.

L'administration de vitamine D constituerait une stratégie neuro-protectrice simple et innovante. La vitamine D est une hormone dont l'action n'est pas uniquement de réguler le métabolisme osseux elle agit sur des systèmes très variés. Elle a ainsi des effets anti-oxydant, immunomodulateur, et elle favorise les mécanismes de réparation vasculaire. Elle intervient de plus dans le développement cérébral et stimule la production de facteurs de croissance indispensables au bien-être et au développement des cellules neuronales. Peu d'études ont été menées dans le but d'évaluer les effets neuro-protecteurs de l'administration de vitamine D dans les situations d'EAI néonatale. Une seule étude a montré qu'une administration de vitamine D diminue la taille des lésions dans le modèle expérimental murin d'HIC mais les mécanismes de neuroprotection et les effets sur les fonctions neurocognitives à long terme n'ont pas été évalués. Chez le nouveau-né, les quelques études observationnelles montrent des taux de vitamine D plus bas chez les enfants présentant une EAI, supportant l'idée selon laquelle un apport en vitamine D pourrait améliorer les symptômes de l'EAI.

L'objectif de notre projet est d'étudier les effets neuro-protecteurs d'une administration précoce de vitamine D dans un modèle murin d'EAI. L'espèce de rat choisie pour notre étude sera Sprague Dawley. La vitamine D sera injectée par voie intrapéritonéale pendant 10 jours. Après chirurgie, réalisée sous anesthésie générale et avec une analgésie appropriée, les rats sont remis auprès de leur mère dans une cage individuelle jusqu'au sevrage et suivis quotidiennement par un personnel formé. Les animaux seront hébergés dans une pièce à température et humidification constantes et contrôlées, avec un accès alimentaire libre (Raffinement).

Une analyse histologique sera effectuée. Cette analyse permettra d'évaluer la sévérité des lésions cérébrales et de mesurer l'impact de la vitamine D sur les changements moléculaires (neuro-inflammation, réparation vasculaire, mort cellulaire). Parallèlement, l'imagerie moléculaire (PET-Scan) adaptée aux petits animaux (sous anesthésie générale) permettra une évaluation précise de l'irrigation du cerveau par les vaisseaux sanguins. Enfin le comportement et les performances neurocognitives (après une habituation des animaux à la pièce de comportement) seront évalués à 2 mois de vie. 160 animaux (80 mâles et 80 femelles) seront nécessaires et suffisants pour montrer une différence dans les différentes investigations comme observé dans les précédents travaux (Réduction).

Les données de cette étude permettront de mieux comprendre les effets de la vitamine D dans les situations d'HIC et de développer des stratégies préventives simples afin de limiter les séquelles neuro-cognitives associées à l'EAI néonatale.

14690 Les maladies liées au métabolisme énergétique (obésité, diabète de type II et syndrome métabolique) constituent un problème clinique majeur du fait de leur prévalence élevée dans le monde et de leurs nombreuses complications, cardiovasculaires et rénales notamment. La compréhension des mécanismes physiopathologiques qui sont à l'origine de ces maladies est importante pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

Dans certains cas, ces maladies métaboliques peuvent être induites par des traitements, comme les traitements immunosuppresseurs (IS) utilisés entre autre en transplantation d'organe. Il s'agit donc d'un effet secondaire grave, grevant le pronostic des sujets transplantés (augmentation des complications cardiovasculaires et diminution de la survie du greffon en transplantation rénale). Il est donc très important de comprendre les mécanismes de ces effets secondaires.

Des travaux initiaux laissent penser que les IS modifient le microbiote intestinal de façon à ce qu'il favorise le diabète et l'obésité. C'est ce que nous proposons d'explorer dans ce projet. Des souris seront soumises ou non au traitement immunosuppresseur que l'on utilise régulièrement en transplantation rénale humaine. De plus, elles seront soumises ou non à un régime gras. Il y aura donc 4 groupes. Dans chaque groupe, des mesures métaboliques seront effectuées (masse grasse et masse maigre, index de masse corporelle, pression artérielle, sensibilité au sucre) et l'analyse

du microbiote intestinal (composition bactérienne des selles de souris) sera faite. En comparant les paramètres métaboliques entre ces 4 groupes et effectuant des corrélations avec les composants du microbiote intestinal, on souhaite établir des corrélations entre certaines bactéries de la flore intestinale (microbiote) et les effets secondaires métaboliques des médicaments utilisés.

Dans un 2e temps, les selles des souris traitées par IS et/ou régime gras seront transférées à des souris sans IS ni régime afin de voir si la flore intestinale à elle seule permet de reproduire les effets secondaires des traitements IS ou du régime gras. Ceci serait alors la preuve de notre hypothèse de départ les IS modifient le microbiote intestinal ce qui favorise alors le diabète et l'obésité.

Ce projet nécessitera l'utilisation de 1100 souris.

Retombées anticipées La mise en évidence d'un rôle du microbiote dans la survenue des troubles métaboliques induits par les IS serait une grande avancée, aussi bien du point de vue conceptuel que du point de vue thérapeutique.

Remplacer les paramètres influençant le microbiote sont tellement nombreux qu'aucun modèle *ex vivo* ne peut reproduire la complexité des interactions entre le microbiote intestinal et son hôte. Il n'est pas possible d'obtenir les mêmes informations sans l'utilisation d'un modèle chez la souris.

Réduire D'après notre expérience des modèles animaux et en se basant sur la littérature, nous utiliserons des groupes de 10 souris, avec une répétition de chaque expérience pour limiter la dispersion biologique des paramètres étudiés. Nous utiliserons donc le moins de souris possible pour atteindre notre objectif.

Raffiner toutes les procédures utilisées dans ce projet sont couramment appliquées à l'homme et ne produisent pas de douleur. Elles ne produisent pas non plus de douleur ni d'effet secondaire notable chez la souris. La sévérité des procédures est due au stress qu'impose la manipulation des souris. Des points limites sont tout de même prévus pour pouvoir euthanasier immédiatement tout animal chez qui une souffrance serait détectée. Par ailleurs, les procédures sont espacées de sorte que l'on puisse effectuer le plus d'analyses sur le moins de souris possible et avec un temps de récupération du stress suffisant entre chaque procédure. L'établissement utilisateur comporte des vétérinaires et une cellule du bien-être des animaux. Les cages d'élevage sont enrichies pour minimiser le plus possible le stress animal.

14691 L'objectif de ce projet est d'identifier des composés chimiques ou biologiques qui pourraient être développés comme nouveaux médicaments dans le traitement de la sclérodémie généralisée. La sclérodémie est une maladie rare du tissu conjonctif qui se manifeste d'abord au niveau de la peau par des lésions fibreuses, mais qui évolue lentement vers une forme plus généralisée avec atteinte des articulations, des viscères et plus spécifiquement de l'œsophage, des poumons, des intestins, du cœur et des reins. L'atteinte des poumons, du cœur et des reins conduit inexorablement à une forte morbidité et mortalité, en l'absence de traitement efficace de la maladie.

Pour réaliser ce projet, un travail important est réalisé au préalable *in vitro* sur des cellules humaines, afin de sélectionner les meilleures molécules à progresser. Etant donnée la complexité des mécanismes impliqués dans cette pathologie, il est difficile de prédire le potentiel thérapeutique d'une molécule uniquement sur la base de résultats *in vitro*. Il s'avère donc nécessaire d'utiliser un modèle animal qui reproduit au mieux les différents aspects de la pathologie humaine, afin de pouvoir évaluer *in vivo* les meilleurs composés identifiés.

Les animaux utilisés dans ce projet seront des souris car l'induction de la sclérodémie sur cette espèce est bien documentée dans la littérature. Trois modèles représentatifs de la maladie sont couverts par ce projet

- Sclérodémie induite par des injections quotidiennes d'un produit chimique
- Sclérodémie induite par immunisation contre une protéine (Topoisomérase I) toutes les 2 semaines
- Sclérodémie induite par immunisation contre la Topoisomérase I en pratiquant des injections répétées de cellules dendritiques présentant deux peptides de la Topoisomérase I

Ces 3 modèles sont caractérisés par la présence d'une fibrose progressive dans la peau et les poumons en quelques semaines (2 à 6 semaines pour le premier modèle, 4 à 8 semaines dans le second modèle, et 10 à 14 semaines dans le troisième modèle).

Les signes cliniques attendus sont modérés. Tout signe clinique anormal fera l'objet d'une surveillance vétérinaire afin d'éviter une souffrance sévère à l'animal.

Une analyse bio-statistique des données générées dans ce projet sera réalisée après la première étude pilote sur chaque modèle, afin d'inclure le minimum requis d'animaux par groupe pour obtenir une réduction significative de 50% de la fibrose dermique et pulmonaire. L'utilisation des données publiées dans la littérature sur ces modèles animaux nous guidera dans un premier temps pour déterminer le nombre minimal d'animaux à inclure par groupe.

Pour ce projet, on peut estimer 1000 souris utilisées au maximum sur une durée de 5 ans, ce qui permet de tester l'efficacité d'environ 14 composés par an.

14692 La formation de la mémoire est un processus indispensable et capital au bon fonctionnement de tout individu et se retrouve au centre de nombreuses maladies cognitives. La découverte que la mémoire peut de nouveau devenir labile lorsqu'elle est réactivée et qu'elle nécessite un processus de reconsolidation pour redevenir stable a renforcé l'idée que la stabilisation de la mémoire est un processus extrêmement plastique. De très nombreuses études se sont intéressées aux bases cellulaires et moléculaires de la reconsolidation, notamment dans l'hippocampe, une structure cérébrale clé dans les processus de mémorisation. Pourtant le processus de reconsolidation n'a jamais été étudié dans le contexte de l'addition continue de nouveaux neurones dans l'hippocampe. Pourtant cette neurogénèse hippocampique confère un nouveau support à la mémoire.

La neurogénèse hippocampique chez l'adulte est la création de nouveaux neurones dans le gyrus dentelé de l'hippocampe. Une décennie de Recherches a établi le rôle de cette neurogénèse dans la formation de la mémoire, en particulier dans les processus mnésiques comme l'apprentissage spatial. Néanmoins le rôle de cette addition continue de néo-neurones sur une mémoire pré-existante n'a jamais été étudié.

C'est pourquoi le rôle de la neurogénèse hippocampique sur la stabilisation de la mémoire reste à déterminer.

Dans ce projet, je propose de démontrer que les néo-neurones jouent un rôle dans la reconsolidation de la mémoire. Des données préliminaires démontrent que les neurones nés dans le cerveau adulte sont activés après la reconsolidation d'un apprentissage spatial. De plus l'inhibition spécifique de ces nouveaux neurones lors de la reconsolidation perturbe la mémoire spatiale. Ce projet consistera donc à démontrer que ces deux observations sont liées et que l'inhibition des nouveaux neurones bloque l'augmentation de l'activité observée après reconsolidation de la mémoire. Afin de démontrer ce point, des rats seront injectés dans l'hippocampe avec un virus qui permet de marquer les nouveaux neurones à leur naissance et qui permet d'inhiber leur activité lorsqu'ils sont matures. Les animaux seront ensuite entraînés dans une tâche d'apprentissage spatial. La mémoire sera ensuite réactivée et nous inhiberons l'activité des nouveaux neurones marqués au cours du processus de reconsolidation. Nous évaluerons enfin l'effet de cette inhibition à la fois lors d'un test de rétention et sur l'activation des nouveaux neurones par des techniques d'imagerie.

Afin de respecter la règle des 3R, des procédures seront développées de façon à réduire au maximum le nombre et l'inconfort des animaux. Notamment, dans un souci de respect du R de réduire, nous prévoyons un maximum de 15 rats par groupe, soit 240 rats au total, nombre minimal nécessaire pour faire des analyses statistiques cohérentes.

Aussi, dans le respect du R de raffiner, un soin particulier sera accordé à l'observation des animaux et à leurs conditions d'hébergement, en particulier lors des périodes post chirurgicales. De plus, des traitements appropriés (anesthésie, anti-inflammatoire, anti-douleur) seront utilisés pour pallier la douleur associée aux manipulations d'injections. En ce qui concerne le remplacement, il est important de noter que cette étude nécessite la visualisation et l'intégrité d'un réseau englobant différentes régions du cerveau et qu'il ne peut donc être réalisé sur des modèles *in vitro*.

14693 La réalisation du présent projet intervient dans le cadre d'un besoin sociétal croissant concernant la prise en charge des individus vieillissants. En effet, le vieillissement de la population de nos sociétés occidentales est en train de devenir un problème de santé publique. Le nombre de personnes atteintes de formes pathologiques de vieillissement, comme la Maladie d'Alzheimer, est en croissance constante et se traduit par une augmentation parallèle des dépenses de santé. Cependant, il convient de distinguer les altérations de la mémoire relevant du vieillissement normal de celles relevant du vieillissement pathologique afin de développer des approches thérapeutiques plus adaptées en fonction du type de vieillissement. L'objectif de ce projet est d'améliorer la caractérisation des déficits de mémorisation liés au vieillissement normal, afin de le distinguer plus clairement de la maladie d'Alzheimer, forme de vieillissement pathologique la plus répandue.

Ce projet sollicite plusieurs tests comportementaux, dont un modèle comportemental en labyrinthe radiaire (décliné en plusieurs variantes) développé au sein de l'équipe au cours des 15 dernières années. Il permet de modéliser chez la souris un type de mémoire atteint au cours du vieillissement normal et pathologique. Les animaux utilisés dans cette étude seront donc des souris (C57Bl6/ J) au nombre de 1300 issues de centres d'élevages agréés. L'utilisation de ces animaux se justifie pour plusieurs raisons

1) Aucune alternative ne permet de se passer de l'utilisation de modèles animaux lorsqu'il s'agit d'étudier les processus de mémorisation. En effet, ce type d'étude repose sur l'analyse du comportement animal et nécessite d'avoir une espèce suffisamment proche de l'espèce humaine pour en extrapoler les résultats.

2) L'organisation du système nerveux central de ces animaux est suffisamment proche de celle de l'homme pour permettre une extrapolation acceptable des résultats obtenus à l'espèce humaine.

3) Le modèle comportemental a été établi chez la souris et l'ensemble des appareils comportementaux que nous utiliserons sont dimensionnés pour cette espèce.

Dans la mesure où le remplacement n'est pas envisageable à l'heure actuelle sur ce type d'études, nous nous efforcerons d'honorer les deux autres points qui sont le raffinement et la réduction. Nous nous appliquerons à préparer méticuleusement les expériences en analysant chaque paramètre, en anticipant les éventuels problèmes et en utilisant que les groupes d'animaux où les conditions expérimentales sont nécessaires et suffisantes pour répondre à notre objectif. De plus, la réalisation des expériences sera confiée à des personnels expérimentés. Le présent dossier démontre par la suite la conformité des expérimentations envisagées qui se feront en complète adéquation avec la nouvelle directive européenne.

14694 Le projet La maladie d'Alzheimer (MA) est une pathologie incurable, diagnostiquée des années après son début. Comprendre les altérations pathologiques cliniquement silencieuses au stade latent de la maladie (c'est-à-dire avant les premiers déficits de mémoire et la neurodégénérescence irréversible) est essentiel pour identifier de nouvelles cibles pour un traitement précoce et probablement plus efficace. L'altération de l'activité synaptique survient dès le stade pré-symptomatique de la MA et est associée à une hyperexcitabilité neuronale et une altération des phénomènes moléculaires impliqués dans la formation et le stockage de la mémoire.

Depuis quelques années, le microbiote intestinal est reconnu comme un important acteur en santé humaine. Des dysbioses (altérations quantitatives, qualitatives et fonctionnelles) ont été décrites dans de nombreuses pathologies intestinales mais également dans de nombreuses maladies psychiatriques (autisme, anxiété, dépression) et neurodégénératives (MA, maladie de Parkinson). Cependant, le lien entre microbiote intestinal et santé humaine est encore majoritairement basé sur des corrélations, et des études fonctionnelles sont nécessaires afin de mieux comprendre ce lien et de pouvoir proposer des thérapies efficaces et potentiellement personnalisées, ciblant le microbiote intestinal.

Dans le cas de la MA, la composition du microbiote des patients au stade déclaré de la maladie est modifiée avec une augmentation des bactéries pro-inflammatoires et une diminution des bactéries anti-inflammatoires. De plus au stade avancé de la pathologie, le microbiote des souris transgéniques modélisant la MA diffère de celui des souris sauvages. La modulation du microbiote

peut ralentir la pathologie de la MA et améliorer les performances cognitives chez la souris transgénique. La modulation du microbiote chez des rats âgés modélisant certains aspects de la MA peut également restaurer certains phénomènes moléculaires impliqués dans le processus de mémorisation. Cependant, il n'existe actuellement aucune donnée sur l'impact de la modulation du microbiote sur les altérations de l'activité des synapses au cours de la MA pré-symptomatique.

L'objectif principal de notre projet est donc d'évaluer l'impact de la modification du microbiote par un traitement antibiotique sur l'activité neuronale de l'hippocampe, site initial de la formation et du stockage de la mémoire. La stratégie expérimentale est basée sur l'utilisation de la lignée de souris transgéniques modélisant la MA et sur laquelle la fonction neuronale sera évaluée au stade pré-symptomatique.

A terme, ce projet devrait permettre de mieux comprendre des aspects émergents de la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer, et ouvrir de nouvelles pistes dans le développement de stratégies innovantes pour le traitement de cette maladie neurodégénérative.

Les animaux

* Type Souris transgéniques APPPS1 modélisant la MA et souris contrôles C57BL/6j.

* Nombre : Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 240 souris expérimentales pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

La conformité au principe des 3R

*Remplacement Un système vivant intégré est nécessaire pour étudier les acteurs mis en jeu dans le développement de la MA. A l'heure actuelle il n'est pas possible de recréer *in vitro* la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs cellulaires rentrant en jeu dans les pathologies liées au vieillissement et dysfonctionnement cognitif de type MA.

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

*Raffinement Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures ont été mise au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal, en limitant la douleur et le stress (anesthésie, analgésie, etc.). Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation, les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum. Le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification ou de maison de type igloo. Nous nous efforçons à chaque instant de raffiner nos procédures afin de garantir le bien-être des animaux en cours de procédure grâce à une surveillance attentive (point limite) et des soins adaptés.

14695 Contexte scientifique Le cancer, maladie caractérisée par une prolifération massive de cellules devenues anormales, est aujourd'hui un fléau mondial. De nos jours, il existe plus de 200 immunothérapies en essais cliniques de phase III afin de lutter contre cette maladie, soulignant ainsi le potentiel prometteur de l'exploration du système immunitaire. Selon le dernier rapport de l'OMS, le fardeau mondial du cancer est aujourd'hui estimé à 18,1 millions de nouveaux cas et 9,6 millions de décès recensés en 2018.

Description des objectifs du projet Afin de traiter les personnes atteintes de cancers, des immunothérapies ont été développées et approuvées. Ces immunothérapies ont montré leur efficacité dans plusieurs types de cancers. Ces différentes molécules visent, plus particulièrement, l'immunité anti-tumorale adaptative (ou acquise, produit une réponse spécifique à un antigène spécifique). Cependant, des études récentes ont montré que le système immunitaire inné a une place prépondérante dans la réponse à ces traitements L'immunité innée est la première ligne de défense vis-à-vis des agents infectieux et pathogènes qui nous entourent. Elle est mise en jeu immédiatement. Elle reste très peu investiguée dans le contexte des immunothérapies anti-cancers.

Il existe donc aujourd'hui un besoin crucial d'étudier ce domaine. C'est en effet, notre hypothèse de travail les échecs des traitements par immunothérapies est que l'immunité innée n'a pas été intégrée à la réflexion.

Ainsi, l'objectif de ce projet est d'identifier les molécules impliquées dans l'immunité innée dans la réponse aux immunothérapies. Nous comptons donc induire des tumeurs sur les souris puis les traiter avec des immunothérapies déjà utilisées en clinique. Nous examinerons au cours de ce projet des variables pouvant interférer avec les traitements et notamment le microbiome des animaux (l'ensemble du contenu microbien des animaux).

Dans le respect des règles des 3R

-Réduire Pour nos expériences, nous avons prévu le nombre nécessaire et suffisant d'animaux, pour garder une puissance statistique dans le traitement des résultats et avoir le nombre de contrôles internes obligatoires, pour prouver l'efficacité des molécules thérapeutiques utilisées.

-Raffiner Afin de respecter la notion de raffinement, et éliminer ou réduire toute douleur, souffrance, angoisse, ou tout dommage durable, susceptible d'être infligé aux animaux, leur bien-être et leur souffrance seront pris en compte quotidiennement de leur naissance à leur mort et évalués par le personnel zootechnique expérimenté. Ainsi, pour chaque procédure impliquant une douleur supérieure à celle d'une piqûre, les animaux seront anesthésiés. De plus, chaque cage (type 2L avec 5 souris par cage) recevra du matériel pour nidifier dans le but de rétablir le répertoire comportemental des souris.

-Remplacer Des méthodologies de culture cellulaire et de modélisation *in vitro* ont été mises en place afin de remplacer au possible l'utilisation d'animaux pour répondre à certaines questions spécifiques à ce projet. Cependant seul un modèle *in vivo* chez la souris récapitulant les éléments de la physiopathologie du cancer et regroupant les multiples acteurs de l'immunité, toutes les voies métaboliques ainsi que du microbiome observés chez l'homme, nous permettra de répondre à notre question scientifique.

Afin de réaliser l'ensemble de nos expériences, 1200 souris sont demandées sur une période de 5 ans.

14696 Le système musculaire nous permet de respirer, marcher, manger, sourire. Il s'agit d'un tissu plastique qui peut adapter sa masse et son métabolisme en fonction des demandes fonctionnelles. Nous étudions différentes situations dans lesquelles l'homéostasie du muscle adulte est perturbée comme la régénération, l'hypertrophie et l'atrophie musculaire. Nous nous intéressons au destin cellulaire des cellules souches musculaires adultes suite à ces perturbations ainsi qu'à l'adaptation des fibres musculaires. Nous cherchons à comprendre les mécanismes qui président à ces adaptations du muscle squelettique adulte.

La plupart de ces situations ne peuvent pas être reproduites *in vitro* ou *ex vivo*. Cependant nous disposons de différents modèles de souris génétiquement modifiées permettant d'étudier les mécanismes sous-jacents au contrôle de la plasticité musculaire.

1536 souris sont nécessaires pour mener à bien nos procédures sur 5 années et permettre l'analyse statistique des différences observées. Différents types de lésion musculaire seront induits sous anesthésie générale et des traitements analgésiques seront administrés afin d'éviter la douleur des souris. Pour chaque protocole nous allons comparer des animaux de différents génotypes à différents temps (3 jours à 45 jours maximum) pour comprendre comment se met en place ce mécanisme.

Pour respecter la règle des 3R, le nombre d'animaux sera réduit au minimum. Les animaux seront surveillés quotidiennement pendant toute la durée de l'expérience afin de détecter des signes de douleur. Nous avons défini les variables analysées et la méthode d'évaluation quantitative du point limite au-delà duquel les animaux recevront un analgésique ou seront euthanasiés. Toutes les expériences qui peuvent être menées en culture seront réalisées en remplacement des procédures sur l'animal, et la mise au point de modèles cellulaires adéquats fait partie intégrante de notre projet.

En conclusion, les études menées amélioreront nos connaissances sur les propriétés des cellules souches musculaires. Nos études sur la plasticité musculaire devraient aussi nous permettre de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à l'atrophie et l'hypertrophie musculaires.

14697 Le développement de structures cellulaires en deux dimensions (2D) repose sur les propriétés auto-organisatrices des cellules souches adultes afin de créer des structures qui récapitulent l'architecture, la fonctionnalité et la signature génétique observées dans les tissus d'origine. On sait peu de choses sur la nature exacte des propriétés cellulaires à l'origine de la génération de ces structures 2D et sur les voies de signalisation régissant leur différenciation. La recherche de molécules à l'origine de la génération de ces structures 2D à partir de cellules épithéliales humaines nous a permis d'identifier un gène qui est surexprimé dans le cancer du sein. Par conséquent, l'objectif de ce projet est de mesurer l'effet *in vivo* de lignées cellulaires humaines de cancer du sein surexprimant ce gène et de lignées délétées pour ce gène.

Nous aurons besoin pour réaliser l'ensemble de nos expériences de 116 souris immunodéficientes sur 2 ans.

Dans le respect de la règle des 3R

Remplacement Tous les tests cellulaires *in vitro* réalisés en amont de cette étude montrent le rôle important de cette protéine dans la tumorigénicité des cellules de cancer du sein. Cependant, les tumeurs sont des modèles intégrés qui font intervenir un grand nombre de mécanismes physiologiques et de tissus avoisinants qui ne peuvent être modélisés *in vitro*. Nous devons donc avoir recours à un modèle physiologique complet et fonctionnel pour cette dernière étape le modèle animal.

Réduction La croissance tumorale des cellules greffées sera suivie de manière longitudinale tout au long de l'expérience, notamment grâce à l'expression de la luciférase dans nos cellules, système très sensible qui nous permettra de réduire le nombre d'animaux utilisés.

Raffinement Le bien-être de nos animaux sera pris en compte de leur naissance à leur mort, les animaux seront hébergés en groupe et l'enrichissement de leur milieu de vie sera systématique. Les animaux recevront une surveillance quotidienne et des soins adaptés (administration d'analgésiques et anesthésiques en pré et/ou postopératoire, mesure hebdomadaire du poids des souris et du volume tumoral, définition de points limites suffisamment précoces et mise en place de critères d'arrêt). Les cellules greffées exprimeront une protéine luminescente ce qui permettra de détecter l'apparition de cellules tumorales très précocement permettant ainsi d'améliorer le bien-être animal par une prise en charge plus rapide.

14698 Les patients traités par radiothérapie pour des cancers de la zone pelvienne développent pour 10 à 20% d'entre eux des effets secondaires (douleurs abdominales, diarrhée, hémorragies...) associés à un dysfonctionnement du tractus gastro-intestinal, et ce, plusieurs années après la fin du traitement. Ces complications chroniques modifient la qualité de vie des patients (inconfort intestinal et états dépressifs) et peuvent dans certains cas compromettre leur pronostic vital. Il n'existe à ce jour aucun traitement efficace. Notre travail s'inscrit dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques afin de réduire les effets toxiques de l'irradiation au niveau de la sphère digestive. Des études récentes montrent que l'ensemble des micro-organismes localisés au sein de l'intestin (microbiote intestinal) joue un rôle dans la toxicité intestinale radio-induite chez les patients bénéficiant d'une radiothérapie abdomino-pelvienne. Le déséquilibre du microbiote, entraînant une perte de certaines bactéries commensales (ou dysbiose) après radiothérapie, est directement associé aux effets secondaires dont souffrent ces patients. L'étude proposée vise à démontrer qu'en empêchant l'installation d'une dysbiose radio-induite par transplantation d'un microbiote fécal sain par voie orale ou rectale, la toxicité radio-induite de la muqueuse colique serait réduite. Pour valider cette hypothèse, nous utiliserons un modèle expérimental de lésions colorectales radio-induites réalisé chez le rat (Sprague Dawley) afin de reproduire les altérations histologiques de la muqueuse colique similaires à celles observées chez des patients traités par radiothérapie. Les rats seront irradiés en doses uniques ou en doses fractionnées dans la zone colorectale. Ils recevront une transplantation fécale à différents temps après l'irradiation pour

évaluer l'efficacité du traitement en fonction de l'installation ou pas de la dysbiose. Ce travail s'articulera en 3 parties 1. La détermination et la caractérisation du modèle expérimental rats, 2. Une analyse au cours du temps de la dysbiose radio-induite, 3. Une étude de l'efficacité d'une transplantation fécale sur les lésions coliques radio-induites. Dans le contexte du bien-être animal, le raffinement est assuré par le fait que les animaux seront manipulés selon la réglementation et les bonnes pratiques en vigueur. Cela permettra de limiter le plus possible leur souffrance. Dans le cadre d'un transfert clinique, la transplantation fécale pourrait permettre de protéger le côlon de la toxicité radio-induite et d'améliorer la qualité de vie des patients. L'objectif de passage en clinique ne permet pas de remplacer la technique *in vivo* par une technique *in vitro*, le modèle animal intégré est le seul moyen d'évaluer pertinemment l'efficacité thérapeutique du traitement. Pour l'ensemble du projet, le nombre estimé d'animaux est de 1716 rats. Le nombre d'animaux a été choisi de manière à ce qu'une pertinence statistique soit atteinte pour chacune des études.

Les animaux seront observés quotidiennement pendant toute la durée des expérimentations. La souffrance de l'animal sera évaluée quotidiennement par le suivi de son comportement et de son aspect physique (aspect du poil, prise alimentaire, perte de poids, diarrhée importante...). Si au cours de l'expérience un animal montre des signes caractéristiques de souffrance, il sera retiré de l'expérimentation et euthanasié si son état est jugé irréversible.

14699 Il est maintenant bien établi qu'il existe une formation de nouveaux neurones (néo-neurogénèse) tout au long de la vie dans l'hippocampe des mammifères, et que ce phénomène joue un rôle dans la mémoire spatiale. L'hippocampe est une structure clé impliquée dans les processus mnésiques. En outre, il appartient au cerveau dit « émotionnel » et joue un rôle majeur dans la régulation de l'humeur et des émotions. Les nouveaux neurones nés à l'âge adulte (Adu) s'intègrent aux réseaux des neurones formés au cours du développement (Dev). Ces neurones adultes semblent posséder des propriétés différentes des neurones développementaux. En effet, des études réalisées sur le rat mâle adulte ont montré que seuls les neurones nés à l'âge adulte (Adu) présentent une plasticité structurelle en réponse à un apprentissage spatial. De plus, les neurones formés à l'âge adulte sont impliqués dans la résolution de problèmes d'orientation spatiale tandis que les neurones développementaux sont impliqués dans la reconnaissance de contexte. Enfin, les neurones Adu jouent un rôle clé dans la régulation des émotions. A partir de ces données, nous avons émis l'hypothèse que le rôle des néo-neurones dépend du moment (stade ontogénique) auquel ils sont formés développement ou adulte. Les neurones ne changent pas de fonction en vieillissant (Adu) mais représentent une population de neurones avec une fonction différente et complémentaire des neurones formés au cours du développement (Dev). Pour tester cette hypothèse, nous proposons d'étudier le rôle spécifique des deux populations de neurones (Adu et

Dev) dans la mémoire et la régulation des émotions, plus particulièrement l'anxiété et la dépression. Puisque ce projet repose sur une approche intégrée nécessitant les capacités cognitives de l'animal, une approche *in vitro*, ou *in silico*, ne peut être envisagée et le projet sera réalisé sur des rats mâles de la souche Sprague-Dawley (n=880). Tous les efforts seront portés afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, et de raffiner les approches utilisées afin de préserver au mieux leur bien-être durant les procédures. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, certains seront utilisés dans plusieurs procédures expérimentales. Les approches utilisées seront raffinées notamment par l'utilisation d'anesthésies générale, locale, d'analgésie ainsi que la surveillance quotidienne des animaux afin de s'assurer de leur bien-être. En cas de mise en danger de se bien-être des procédures ont été mises en place et des points limites ont été définis en accord avec la vétérinaire responsable. Les animaux seront hébergés dans des cages collectives enrichies avec des rondelles de nid de peuplier compressées jusqu'aux procédures comportementales où ils seront alors hébergés en cage individuelle enrichie (rondelles de nid de peuplier compressées).

14700 Le diabète de type 2 (DT2) et la dépression constituent des problèmes de santé publique majeurs. Ces 2 pathologies présentent une forte co-morbidité et un lien bidirectionnel. En effet, d'une part, le DT2, caractérisé par une hyperglycémie et une résistance de l'organisme à l'insuline, est associé à une prévalence élevée de développer une dépression et d'autre part, la dépression constitue un

facteur de risque aux troubles métaboliques et au DT2. Cependant les processus physiopathologiques sous-tendant ce lien bidirectionnel restent mal connus et sont difficilement étudiables chez l'homme.

La plupart des modèles animaux utilisés en recherche fondamentale sur le DT2 utilise des modèles obèses et ne reflète pas le contexte clinique complet du DT2 humain. En effet, le DT2 n'est pas toujours associé à l'obésité et il est diagnostiqué à un âge de plus en plus jeune. Il a par ailleurs une composante génétique importante et est fortement augmenté en cas de diabète gestationnel. Nous utiliserons un modèle préclinique de rat non obèse atteint d'un DT2 la lignée Goto-Kakizaki (GK). L'utilisation du modèle GK permet d'étudier l'impact du diabète sur le cerveau indépendamment de l'obésité. Le modèle GK est par ailleurs caractérisé par une exposition précoce à un diabète gestationnel. Le modèle de diabète spontané chez le rat GK caractérisé par une période prédiabétique représente un outil majeur dans l'étude de la physiopathologie du DT2 et des troubles neuropsychiatriques associés au diabète.

Le but de notre étude est d'explorer, grâce à ce modèle rongeur, le rôle des dérégulations de l'axe corticotrope et des processus inflammatoires dans les troubles émotionnels associés au DT2. Cette étude s'inscrit dans un projet collaboratif plus large impliquant plusieurs équipes visant à explorer les changements épigénétiques au niveau du pancréas et du cerveau des rats GK. L'impact global de ce projet sera d'améliorer notre compréhension des processus sous-tendant le lien DT2 - dépression.

Ce projet nécessitera l'utilisation de 926 rats sur une durée de 4 années.

La règle des 3rs sera respectée dans ce projet. L'étude de comportements anxieux-dépressifs ne peut être réalisée que sur animaux vivants ce qui rend impossible le remplacement de ceux-ci par des modèles *in vitro*. Le nombre d'animaux sera réduit au mieux grâce à l'utilisation de tests statistiques montrant la différence entre plusieurs groupes. Toutes les précautions possibles (analgésie, enrichissement des cages d'hébergement) seront prises afin de raffiner nos procédures et réduire au mieux l'inconfort des animaux.

14701 L'ostéite est une inflammation de la zone médullaire et/ou corticale osseuse chronique ou aigue qui peut être liée à une infection bactérienne. Ces ostéites infectieuses bactériennes sont une entité difficile à traiter avec une forte morbi-mortalité associée. La bactérie la plus souvent rencontrée dans cette pathologie est *Staphylococcus aureus*. La moindre diffusion des antibiotiques au niveau du site osseux infecté et l'augmentation de la fréquence des bactéries multi-résistantes expliquent la difficulté à traiter ces infections.

L'exposition aux antibiotiques favorise l'émergence de résistance bactérienne. La constante augmentation des Bactéries Multi-Résistantes (BMR), est liée entre autre à la pression de sélection exercée par l'utilisation répétée et prolongée des antibiotiques. Ce problème de santé publique mondial incite à réfléchir à l'économie et à l'optimisation de l'utilisation des antibiotiques. Trouver des traitements alternatifs est donc important.

La photothérapie dynamique anti-microbienne (PDT) associée à l'eau oxygénée, existe depuis plusieurs années en médecine bucco-dentaire dans le traitement des parodontopathies bactériennes. Dans cette situation, elle constitue une alternative complémentaire ou substitutive au traitement antibiotique. Ses propriétés bactéricides ont été étudiées sur des modèles *in vitro* et *in vivo*. Le mécanisme d'action repose sur la création de radicaux libres par l'excitation de l'oxygène. Cette réaction est liée à l'énergie photonique libéré par le rayonnement d'un laser sur un photosensibilisant. Il en résulte une bactéricidie qui est au final une réaction cytotoxique photochimique.

Malgré l'existence d'études dans la littérature sur l'utilisation de la PDT dans l'ostéite bactérienne, il n'existe pas de protocole défini consensuel. Notre hypothèse est que l'utilisation de la PDT avec l'eau oxygénée est bactéricide dans le modèle d'infection osseuse à *Staphylococcus aureus* chez la souris. En cas d'efficacité, ce traitement pourrait apporter une alternative de traitement possible aux ostéites des pieds diabétiques (ostéite de contiguïté avec contact direct depuis la plaie jusqu'à l'os infecté). Quelques études ont montré des résultats positifs dans ce sens. Si l'efficacité

antimicrobienne semble être présente, la tolérance est également bonne sans effet indésirable majeur noté.

Le but de notre étude est d'évaluer la bactéricidie de la photothérapie dynamique anti-microbienne utilisant l'eau oxygénée dans un modèle d'ostéite de tibia chez la souris.

Pour cela, 264 souris Swiss femelles vont être utilisées.

Ce projet est réalisé dans le respect de la règle des 3R

- Remplacer l'évaluation et la comparaison de l'activité de la PDT sur une souche ne peuvent pas être simplement réalisées de façon *in vitro* (faible corrélation *in vitro-in vivo*).

- Réduire Les premiers temps de l'expérimentation consistent à la validation du modèle avec les souches à étudier, ce qui permet d'utiliser le moins d'animaux possible lors de l'évaluation thérapeutique proprement dite. Pour les évaluations thérapeutiques, le nombre de souris par groupe a été réduit au minimum afin de garder une analyse statistique fiable.

- Raffiner : - Avant l'expérimentation

- o Conditions d'hébergement Acclimatation des animaux durant une semaine avant l'expérimentation. Assurance d'une non surpopulation dans la salle d'hébergement. Les animaux sont conservés dans des cages répondant aux dernières normes, enrichies de frisottis. La litière est changée une fois par semaine avec accès libre à l'eau et à la nourriture (alimentation spécifique pour rongeur).

- o Détermination des points limites figure 5, annexe 1. - Pendant l'expérimentation

- o Soins pré et postopératoire Les souris reçoivent une injection sous cutanée de 30µL de buprénorphine (0,1mg/kg) 30minutes avant le traitement puis 4h et 8h après. Cette injection sera renouvelée 3 fois par jour les 2 jours suivants (période de sévérité du protocole).

- o Evaluation des signes généraux Application des points limites (cf raffinement avant expérimentation)

- o Procédures Les procédures d'infection et de traitement sont réalisées sous anesthésie générale.

- o Euthanasie dislocation cervicale après pré anesthésie par inhalation d'isoflurane.

Le bien-être des animaux sera surveillé tout au long de l'étude.

14702 Depuis la découverte de l'effet Warburg sur la reprogrammation du métabolisme du glucose dans les années 1920, il y a un intérêt grandissant dans l'étude et la compréhension du métabolisme des cellules cancéreuses afin de développer de nouvelles solutions thérapeutiques pour combattre ces pathologies.

Le glucose et la glutamine sont parmi les deux molécules métabolisées par les cellules cancéreuses pour leur prolifération et leur croissance. Le glucose est exploité par les cellules comme substrat énergétique pour produire l'énergie nécessaire au fonctionnement des cellules. La glutamine est quant à elle employée pour produire diverses molécules qui sont indispensables à la survie et la prolifération des cellules cancéreuses.

Dans ce cadre, nous souhaitons développer, dans le respect de l'éthique et du bien-être animal, une méthode d'évaluation de la conversion par la glutaminase de la glutamine en glutamate par la spectroscopie de la glutamine et du glutamate enrichis en carbone 13. A l'heure actuelle les techniques d'évaluation, *in vivo*, de la concentration de Glutamine et de Glutamate comme la spectrométrie de masse impliquent nécessairement le sacrifice de l'animal pour avoir accès aux tissus et réaliser le dosage de ces molécules. Ainsi avec les techniques actuelles le suivi longitudinal de l'efficacité des inhibiteurs de la glutaminase implique de sacrifier un groupe d'animaux à chaque fois que l'on souhaite étudier l'activité de la glutaminase.

A l'inverse les techniques par spectroscopie par résonance magnétique nucléaire sont des approches totalement atraumatiques et le développement de cette technique permettra de disposer d'une méthode d'évaluation *in vivo* de l'activité de la glutaminase et ainsi d'une méthode d'évaluation de l'efficacité des composés pharmacologiques modulant l'activité de cette enzyme. Ainsi pour

réaliser un suivi longitudinal, avec ces techniques par spectroscopie du carbone 13, il n'est pas nécessaire de sacrifier les animaux après une première mesure. Chaque animal peut être à nouveau étudié pour suivre les effets au long cours d'un traitement par exemple.

Le développement de cette technique s'inscrit dans la règle des 3R et notamment du R de réduire puisque le développement de cette approche permettra de réduire le nombre d'animaux nécessaires pour suivre l'efficacité d'une molécule pharmacologique.

Dans le cadre de ce projet il est donc envisagé de développer une méthode par spectroscopie du carbone 13 pour étudier la conversion glutamine en glutamate suite à une injection intraveineuse d'une solution de glutamine enrichie en carbone 13. Préalablement à toute étude sur animaux, nous réaliserons des tests *in vitro* sur des tubes mimants les animaux évitant ainsi d'avoir recours systématiquement à l'animal.

Les études sur animaux, seront menées sur une cohorte de 20 animaux qui seront des rats (*rattus norvegicus*) de la souche Wistar.

Afin de réduire le stress et l'inconfort des animaux pendant leur stabulation ceux-ci sont suivis quotidiennement par le même manipulateur et les mêmes animaliers. L'environnement des animaux sera enrichi avec de petits tunnels en plastiques, de morceaux de coton et de la paille de peuplier pour permettre la nidification et des morceaux de bois à ronger

Afin de réduire au maximum l'inconfort des animaux au cours des procédures expérimentales, ceux-ci seront anesthésiés tout au long de la procédure par une inhalation d'un mélange d'air isoflurane à un débit de 0.8 à 1 l.min⁻¹ à l'aide d'un masque d'anesthésie adapté à la morphologie des rats. Préalablement, l'induction de l'anesthésie aura été assurée par une inhalation d'un mélange air-isoflurane à 4% délivré à débit de 0.8 à 1 l.min⁻¹ en plaçant les animaux dans une cage à induction. Une fois anesthésié, les animaux seront placés dans un berceau chauffant afin de maintenir leur température corporelle. Lors de l'anesthésie, un gel ophtalmique (Ocry-gel) sera appliqué afin de prévenir tout dessèchement des yeux.

Les points limites définis pour ce projet lors de la procédure expérimentale et qui provoqueront l'arrêt du protocole sont :

-Un saignement inexplicé au niveau du point d'injection. Dans ce cas, le protocole sera interrompu et les animaux seront euthanasiés.

-Une douleur manifeste, par exemple cris des animaux lors des protocoles d'injection. Dans ce cas le protocole sera interrompu et les animaux seront euthanasiés. Dans ce cas le protocole d'injection sera réévalué et la concentration de la solution sera réduite afin d'éviter toute sensation douloureuse pour l'animal.

-La chute du rythme respiratoire. En effet au cours du protocole un capteur sera positionné sur le thorax de l'animal pour suivre son rythme respiratoire. En cas de chute brutale inférieure à 30 cycles respiratoires par minute, le protocole sera interrompu et les animaux seront euthanasiés.

14703 La césarienne est une procédure chirurgicale simple réalisée de façon programmée ou en urgence. Elle représente l'intervention chirurgicale la plus fréquente dans les pays développés et son taux peut alors atteindre 30%. Ces dernières années, les gouvernements et les cliniciens ont exprimé leur préoccupation face à l'augmentation du nombre d'accouchements par césarienne partout dans le monde. En effet, même si elle a initialement contribué à l'amélioration de la santé des mères et des enfants, la césarienne est associée à de possibles complications chez le nouveau-né. A court terme, les principales complications décrites dans la littérature sont les complications respiratoires. En ce qui concerne les complications à long terme, plusieurs études récentes montrent un lien important entre césarienne et maladies chez l'enfant telles que l'asthme, les maladies inflammatoires de l'intestin, l'obésité, le diabète de type 1. Ces associations seraient dues à une altération du microbiote intestinal (ensemble des bactéries présentes dans l'intestin) qui participe fortement à la mise en place du système immunitaire. En ce qui concerne l'impact sur le système nerveux central, plusieurs études chez l'homme montrent une association entre césarienne et trouble de l'attention ou autisme ainsi que des altérations du microbiote intestinal chez les enfants autistes. Chez l'animal et notamment dans le modèle murin, plusieurs études montrent une

association entre césarienne, altération du microbiote intestinal et comportements anxieux, troubles des interactions sociales ou comportements répétitifs chez le rat.

Les objectifs de ce projet visent à démontrer l'impact de la naissance par césarienne et de l'altération du microbiote intestinal sur les processus neuro-inflammatoires et sur le développement des cellules cérébrales des souriceaux à la naissance.

Pour cela nous réaliserons 2 groupes de souris définis par la voie d'accouchement. Les souriceaux du groupe 1 naîtront par césarienne après avoir pratiqué l'euthanasie de la mère et seront adoptés. Ceux du groupe 2 naîtront par voie naturelle. Nous réalisons l'adoption des souriceaux également dans le groupe 2 pour que les groupes soient comparables. L'analyse du processus neuro-inflammatoire et des cellules cérébrales ainsi que l'analyse du microbiote intestinal sera étudiée au 1er, 5ème, 10ème et 45ème jour après la naissance.

La règle des 3R appliquée :

Remplacement au vu de notre expérience et des données de la littérature, l'étude de l'impact de la voie d'accouchement sur le développement et l'inflammation cérébrale ainsi que sur le microbiote ne peut être envisagée qu'« *in vivo* » chez un modèle de souris non transgénique.

Réduction Les expériences seront réalisées chez 616 animaux. Ce projet se déroulera sur 3 ans. La simplicité et la bonne reproductibilité de ce modèle expérimental permettront de limiter le nombre d'animaux nécessaire à la réalisation d'analyses statistiques.

Raffinement afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligée aux animaux, des points limites précoces et adaptés ont été définis pour effectuer le suivi rapproché des animaux grâce à des grilles de scoring en fonction de l'âge des animaux. Dans le groupe 1, la césarienne sera réalisée après euthanasie de la femelle gestante. L'adoption des souriceaux dans les deux groupes sera réalisée après les avoir réchauffé et mis en contact avec la litière de la femelle adoptante. Un enrichissement du milieu sera réalisé pour chacune des cages. L'ensemble des animaux impliqués dans ce projet sera euthanasié à l'issue du projet.

14704 Notre projet a pour objectif de comprendre quels circuits neuronaux contrôlent l'anxiété chez la souris. Afin que les connaissances fondamentales issues de notre projet puissent être extrapolées à l'Homme, notre étude sera généralisée aux deux sexes. La réalisation du présent projet intervient dans le cadre d'un besoin sociétal croissant ou l'anxiété est un problème de société majeur affectant près de 18 % de la population. L'avantage évident de ce projet est de proposer de nouveaux circuits impliqués dans l'anxiété et de proposer de nouvelles cibles pour le développement de stratégies thérapeutiques alternatives pour détecter et traité l'anxiété, mais nécessite le recours à l'expérimentation animale.

Le but de ce projet est d'établir, chez une espèce, la souris, les adaptations synaptiques qui se mettent en place au niveau des circuits du BNST en situation physiologique ou après l'exposition à un stress aigu. Pour cela, les approches expérimentales principalement utilisées seront 1) des approches en électrophysiologie *ex vivo* et *in vivo* sur animal anesthésié, pour évaluer l'impact de l'exposition à un stress aigu sur ces circuits et 2) des analyses immunohistochimiques 3) des tests comportementaux pour évaluer l'impact de l'activation ou de l'inhibition de ces circuits sur l'anxiété grâce à l'utilisation de chirurgie stéréotaxique, d'injections cérébrales, d'implantation intracérébrale de fibres optiques ou de canules. Dans ce projet nous utiliserons cinq lignées de souris transgéniques exprimant spécifiquement un marqueur au niveau des neurones à dopamine, au GABA ou au Glutamate nous permettant ainsi de les identifier et manipuler spécifiquement.

Puisque ce projet repose sur une approche intégrée nécessitant les capacités d'intégration contextuelle de l'animal, ce projet ne peut être conduit par des approches de modélisation computationnelle ou de cultures de cellules. La souris est une des espèces de rongeur majoritairement utilisées en neuroscience. L'utilisation d'un trop grand nombre d'animaux est contraire à l'éthique, mais si trop peu d'animaux sont utilisés, l'expérience peut manquer de puissance statistique. Ainsi, afin de respecter la règle des 3R, des procédures seront développées de façon à réduire au maximum le nombre et l'inconfort des animaux. Notamment, dans un souci de respect du R de réduire, nous prévoyons un maximum de 12 animaux par groupe, certaines

approches expérimentales tels que les tests comportementaux pourront être réalisés sur les mêmes groupes d'animaux en respectant une période de repos entre chaque test. Les approches d'électrophysiologie que nous proposons participent à réduire le nombre d'animaux utilisés, en permettant de multiplier le nombre de variables collectées par animal. Aussi, dans le respect du R de raffiner, un soin particulier sera accordé à l'observation des animaux et à leurs conditions d'hébergement (cages collectives enrichies avec des objets adaptés changés de façon hebdomadaire), avec une attention particulière lors des périodes chirurgicales en utilisant les anesthésiques et anti-douleurs appropriés pour pallier la douleur associée aux opérations chirurgicales. Pour définir ces dommages et contraintes subis par l'animal, nous avons établi une grille d'évaluation clinique et de surveillance. Pour réduire au maximum les conséquences de ces dommages, nous définirons des points limites suffisamment précoces et mettrons en place des critères d'arrêts. De plus, la réalisation des expériences sera confiée à des utilisateurs expérimentés. En ce qui concerne le remplacement, il est important de noter que cette étude nécessite la visualisation et l'intégrité d'un réseau englobant différentes régions du cerveau et qu'il ne peut donc être réalisé sur des modèles *in vitro*.

Le nombre total d'animaux utilisés sera 1196 souris sur une durée totale du projet de 5 ans. Le présent dossier démontre par la suite la conformité des expérimentations envisagées qui se feront en complète adéquation avec la directive européenne.

14705 On estime que plus de la moitié des patients atteints de cancer développe un syndrome de cachexie, pouvant être associé à de l'anorexie, résultant en une perte progressive de tissu adipeux et de masse musculaire. La cachexie est un syndrome inflammatoire sévère et a un impact conséquent sur la qualité de vie des patients et même leur survie. En effet, on estime à environ 20% la mortalité directe induite par une cachexie chez les patients atteints d'un cancer. De plus, certains traitements anti-cancéreux, comme les chimiothérapies ou d'autres molécules, peuvent elle-même induire un syndrome de cachexie. Cette problématique de santé publique nécessite de mettre en place des modèles d'étude pertinents afin de pouvoir proposer des solutions adaptées d'un point de vue thérapeutique.

Les modèles animaux de cancer demeurent des éléments critiques dans la compréhension de la physiopathologie du cancer, l'identification de nouvelles cibles et de nouveaux candidats médicaments et la compréhension des mécanismes de résistance.

Une partie des procédures décrites dans ce projet correspondent à la création de différents modèles de tumeurs chez le rongeur. L'objectif de ces procédures est de créer différents types de tumeurs chez la souris ou le rat, après administration de cellules tumorales, afin de générer une cachexie, puis de mesurer différents critères (taille de la tumeur, survie), et de tester l'efficacité ou la toxicité de molécules aux propriétés anticachexiques décrites ou potentielles ou de solutions nutritives. La création de ce type de modèle dans ce projet ne peut pas être remplacée par des méthodes alternatives car l'induction de tumeur s'accompagne de modifications physiopathologiques et de la création d'un microenvironnement spécifique ne pouvant actuellement pas être reproduites *in vitro*, ces modifications sont nécessaires pour l'étude d'efficacité de molécule avec une activité anticachexique.

De plus, une autre procédure décrite dans ce projet correspond à différents modèles de cachexie induite par des traitements anticancéreux chez la souris ou le rat, et de tester l'efficacité ou la toxicité de molécules aux propriétés anticachexiques décrites ou potentielles ou de solutions nutritives afin de prévenir et traiter la cachexie médicamenteuse. La procédure ne peut pas être remplacée par des méthodes alternatives car l'effet systémique des molécules ne peut pas être reproduit par des modèles alternatifs.

L'utilisation de la souris ou du rat comme espèce hôte se justifie par le fait que ces espèces développent rapidement des tumeurs après injection de cellules tumorales et qu'il s'agit des espèces les mieux décrites dans la littérature.

Le nombre d'animaux utilisés pour chaque test sera optimisé de façon à permettre une interprétation correcte des résultats en se basant sur une analyse de puissance suffisante pour les tests statistiques à appliquer, limitant ainsi une répétition du test.

Le projet consistera à développer différents modèles puis de tester des molécules de référence connues pour avoir une activité anticachexique mais aussi des molécules non encore décrites. Le développement consistera à définir un nombre suffisant de cellules pour générer une tumeur chez l'animal ou d'utiliser un traitement connu pour induire de la cachexie en clinique humaine. Un effectif de 8 à 14 animaux par groupe sera utilisé pour évaluer l'efficacité et la toxicité de molécules. Un test comportera minimum trois groupes (un contrôle, un anticachexique de référence ou une molécule de comparaison, et au minimum une dose de substance test), soit un minimum de 24 animaux par test. Ainsi en se basant sur une dizaine de modèles à développer et tester à hauteur d'environ trois fois par an au courant de ce projet, nous estimons à 960 le nombre d'animaux qui seront utilisés par an (i.e. 2880 sur trois ans de projet).

Le raffinement des méthodes expérimentales afin de réduire au maximum la souffrance animale sera mis en œuvre grâce à l'utilisation de points limites clairement établis (incluant une surveillance de l'aspect général, un suivi de poids), permettant d'euthanasier tout animal présentant des signes de douleur, de souffrance ou d'angoisse. Le programme d'anesthésie et d'analgésie est défini par un vétérinaire, afin de réduire au maximum toute douleur ou sensation de souffrance. De la même manière, lorsque les protocoles l'exigent, les chirurgies sont raffinées au maximum, en mettant à disposition des animaux, de l'oxygène à concentration ajustable et des tapis chauffants. Aussi, il est mis en place un enrichissement complet dans leur hébergement, sous la forme de jouets, litière, objet de nidification, objet à ronger ou mastiquer, présence de congénère..

14706 La myéline est un élément essentiel de la conduction nerveuse et sa destruction aboutit à long terme à des troubles neurologiques graves chez les patients atteints de la sclérose en plaques (SEP). Une des caractéristiques intéressantes de la SEP est que parallèlement au développement de la maladie un processus de réparation endogène, nommé la remyélinisation, s'enclenche. Alors que l'inflammation est l'une des causes principales de la perte de myéline, la présence des cellules immunitaires et la production de molécules chimio-attractantes est un élément indispensable à la mise en place de la remyélinisation. Nous proposons d'associer plusieurs domaines de recherche la génétique, l'immunologie et la neurobiologie pour établir de quelle manière le processus immunitaire peut favoriser la remyélinisation endogène. Cette approche innovante et pluridisciplinaire vise à identifier de nouvelles cibles potentielles permettant de moduler l'inflammation de manière à favoriser la réparation ouvrant ainsi la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Nous utiliserons des souris Nude car, de par leur système immunitaire déficient, on ne risque pas de rejet de greffe de cellules humaines.

Lors de l'élaboration du protocole expérimental, afin de réduire le nombre d'animaux à utiliser, nous avons choisi un modèle de remyélinisation murin dont la chronologie du processus de réparation est bien définie. Ainsi nous avons pu réduire à 2 temps après la lésion, le temps de sacrifice pour évaluer l'effet des lymphocytes sur la réparation. De plus, nous avons évalué par tests statistiques le nombre minimum d'animaux à greffer pour chaque patient et pour les témoins (20 souris par cas avec 5 souris pour l'étude immunohistochimique et 5 pour la microscopie électronique).

Nous utiliserons donc 1000 souris pour cette étude se répartissant sur 5 sous-groupes de patients au profil génétique différent et un groupe de donneurs sains.

La règle des 3R a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée sur le terrain 1) remplacement les études *in vitro* et sur animaux invertébrés ne permettent pas l'étude de processus biologiques complexes comme la réparation des lésions de la myéline. Le rongeur est donc l'une des espèces les plus appropriées pour ce type d'étude. 2) réduction le nombre d'animaux utilisés est réduit au strict minimum nécessaire afin de générer des données statistiques significatives; 3) raffinement les procédures prennent en compte des temps de récupération et des nombres d'essais visant à réduire le stress et la fatigue des animaux. Afin de réduire la douleur, un analgésique sera

injecté juste avant et 6 heures et 24 heures après chaque chirurgie. L'observation des souris se fera pendant 4 jours après la dernière opération pour surveiller si des signes de douleurs ou de stress apparaissent.

14707 L'objectif principal de ce projet est d'induire des modèles de dégénérescence rétinienne chez les primates non humains (PNH) compatibles avec l'évaluation de l'innocuité et de l'efficacité des transplantations de photorécepteurs dérivés de cellules souches. Les dégénérescences rétiniennes héréditaires telles que la dystrophie bâtonnets-cônes sont une cause majeure de cécité humaine causée par un grand nombre de mutations dans plus de 200 gènes exprimés dans la rétine - dont certains n'ont pas encore été identifiés. Ces maladies ne surviennent pas spontanément chez les PNH, ce qui rend difficile l'évaluation de la thérapie cellulaire chez eux, alors qu'ils constituent le modèle animal pertinent qui présente une macula.

Nous proposons de générer des modèles macaques avec dégénérescence rétinienne des photorécepteurs et d'évaluer leur utilité pour étudier la faisabilité à court terme de la transplantation de photorécepteurs chez des macaques immunodéprimés afin d'éviter tout rejet des cellules transplantées. Nous transplanterons des photorécepteurs dérivés de cellules souches pluripotentes humaines induites dans la zone dégénérée.

Pour ce projet on utilisera des PNH, seule espèce ayant des propriétés anatomiques similaires à l'homme au niveau de l'œil, notamment de la rétine. Le recours à l'animal est nécessaire, car aucun milieu de culture ou système synthétique ne permet aujourd'hui de reproduire la complexité architecturale des cellules de la rétine. Ce projet s'appuie sur des études préalables *in vitro* et chez le rongeur. Le nombre d'animaux (20) a été réduit au minimum nécessaire pour obtenir des données statistiquement significatives. Chaque animal est utilisé pour l'ensemble des étapes du projet, de l'injection intraoculaire au prélèvement des tissus d'intérêt pour l'analyse. La mise en œuvre d'un suivi longitudinal non invasif (imagerie *in vivo* sur les animaux anesthésiés) minimise le nombre d'animaux utilisés ainsi que la contrainte qui leur est imposée. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions et des critères de points limites sont prévus pour prendre en compte des effets inattendus. Les actes chirurgicaux sont réalisés sous anesthésie générale et entraînent une douleur modérée. Une observation régulière des animaux sera faite pour détecter tout signe de détresse, et si cela est jugé nécessaire, la douleur postopératoire sera gérée par l'administration d'analgésiques. Les animaux seront hébergés en groupe, dans des conditions enrichies en favorisant les interactions sociales.

14708 En cas d'épizootie, il est nécessaire de recourir en urgence à un dépeuplement dans les élevages de porc à risque. Dans ce contexte, le projet vise à valider chez le porc une technique de mise à mort efficace, rapide et limitant autant que possible la souffrance animale. Quatre mélanges gazeux différents, ainsi que trois durées d'exposition à ces gaz seront testés afin de déterminer la méthode la plus adaptée.

Dans le cadre de la règle des 3R :

-Réduction : afin de limiter le nombre d'animaux testés, seul un animal par lot sera utilisé, soit 12 porcs au total. Les études antérieures montrent qu'il n'y a pas de variations interindividuelles dans la réaction des animaux au gazage (pas d'effet sexe, âge, poids).

-Raffinement : une attention particulière sera portée avant le début des tests à l'amenée du porc vers le caisson pour réduire le stress de l'animal. Par ailleurs, un vétérinaire sera sur place pour intervenir si besoin dans les plus brefs délais sur l'animal si besoin à l'issue de l'exposition au traitement expérimental.

-Remplacement : seules des études préliminaires *in vivo* permettront de répondre à l'objectif de définir le meilleur couple "mélange de gaz et temps d'exposition".

14709 La lumière, en plus de son rôle dans la vision, est également impliquée dans la régulation des rythmes circadiens, de l'humeur, de la vigilance ou encore des performances cognitives. L'utilisation grandissante d'éclairages artificiels et des écrans a un retentissement sur les rythmes circadiens

dont le rythme veille-sommeil, mais également sur de nombreux autres paramètres physiologiques tels que les performances cognitives, l'humeur ou la qualité de l'éveil et du sommeil. Pourtant ces effets physiologiques de la lumière peuvent également être bénéfiques que ce soit à visée thérapeutique ou en application sociétale. En effet, si la lumière, lorsqu'elle est utilisée de façon non appropriée, peut être néfaste sur la santé, son utilisation thérapeutique est bien démontrée dans certains domaines comme les troubles du rythme circadien veille-sommeil ou certaines formes de dépression. De plus, des données récentes laissent entrevoir la possibilité de nouvelles applications cliniques de la luminothérapie, notamment dans l'insomnie, mais ceci nécessite au préalable de mieux comprendre le rôle des différents paramètres de l'éclairage, en particulier le spectre de couleur et l'intensité de lumière.

En effet quelques travaux préliminaires dont certains de notre équipe suggèrent que la lumière rouge, qui était jusqu'à aujourd'hui considérée comme une lumière contrôle, c'est-à-dire n'affectant pas les variables physiologiques et comportementales, puisse agir sur le sommeil avec de possibles applications cliniques immédiates.

L'objectif de notre projet est de mieux comprendre les mécanismes qui sous-tendent cette influence de la lumière rouge, notamment par le biais de son action sur les différents types de cellules photoréceptrices au sein de la rétine et sur les centres supérieurs du cerveau impliqués dans la régulation des rythmes circadiens, du sommeil et de la veille.

Grâce à un modèle de souris ne produisant pas la mélanopsine, et donc ne transmettant pas l'information lumineuse non visuelle au cerveau, nous pourrons évaluer l'effet spécifique de cette intégration d'information sur le comportement en comparant des animaux dépourvus de mélanopsine (Opn4^{-/-}) et des animaux sauvages (Opn4^{+/+}) suite à différentes expositions lumineuses.

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

Réduire Afin d'optimiser le nombre d'animaux, chaque lot pourra subir différents paradigmes lumineux consécutifs en respectant un temps minimal entre chaque paradigme afin d'obtenir une récupération complète de l'architecture naturelle du sommeil entre deux conditions.

Raffiner Dans le cadre du raffinement des conditions d'hébergement, les animaux sont maintenus jusqu'à l'expérience en groupe sociaux, un enrichissement est réalisé par l'ajout de nids. D'autres enrichissements tels que tubes, maisons ou balancettes ne peuvent être utilisés car empêcheraient l'exposition des animaux à la lumière et donc fausseraient les résultats du projet. Les procédures invasives seront réalisées sous anesthésie profonde et analgésie. La température sera maintenue grâce à un tapis chauffant thermostaté. Les animaux seront suivis quotidiennement et la douleur évaluée grâce à une grille d'évaluation objectivée comportant des points limites prédictifs parfaitement établis. Ces points permettront d'interrompre les procédures à tout moment limitant ainsi la douleur et/ ou l'inconfort infligé à l'animal.

Au vu de la variabilité dans les réponses comportementales, le projet, effectué sur une durée maximale de 3 ans, implique un effectif total maximal de 120 souris Opn4^{+/+} et 120 souris Opn4^{-/-} mâles adultes soit un total maximal de 240 animaux.

- 14710** La dépression majeure concerne environ 17 % de la population française, ce qui en fait le trouble psychiatrique le plus fréquent. La classe d'antidépresseur prescrite en première intention sont les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine, mais 50% des patients déprimés ne répondent pas correctement à ce type de traitement, d'où l'importance de chercher des molécules capables de potentialiser leur effet. Le LSD est un hallucinogène qui à faible dose, et en accompagnement d'une psychothérapie, s'est montré être un antidépresseur à effet prolongé. Notre objectif est double i) vérifier si cette molécule est capable de potentialiser l'action des antidépresseurs classiques et ainsi d'améliorer la réponse des patients résistants aux traitements actuels, et ii) comprendre par quels récepteurs passe l'effet antidépresseur du LSD pour, à terme, proposer des molécules ciblant uniquement les récepteurs en cause. Il s'agit donc d'une recherche translationnelle.

Pour mener à bien cette étude nous utiliserons deux modèles de dépression chez le rongeur un modèle de dépression inflammatoire par injection de lipopolysaccharide (LPS) chez le rat et un modèle de dépression induit par le stress chez la souris. Chez le rat, l'administration de LPS créera un état de maladie de quelques heures avec arrêt de la prise alimentaire et de l'exploration de l'environnement. Chez la souris, le stress provoque de l'anxiété outre l'état dépressif recherché. Ces modèles d'étiologies différentes présentent une sévérité de classe modérée car traduisant certain symptôme de la dépression humaine, mais cela nous permettra de valider ou d'invalider la potentialisation d'un antidépresseur classique par le LSD en testant leurs effets conjoints sensés améliorer l'humeur de ces rongeurs. Dans un deuxième temps, nous approcherons l'action du LSD sur les récepteurs sérotoninergiques situés dans un noyau cérébral contenant des neurones sérotoninergiques (le raphé dorsal) par chirurgie sous anesthésie générale, ce qui nous permettra d'enregistrer l'activité électrique des neurones par électrophysiologie. Le LSD et des antagonistes des différents récepteurs seront administrés par injection. Cette procédure est classée "sans réveil" et s'effectuera chez le rat. Tous les animaux seront euthanasiés par l'administration d'une dose létale d'Euthasol à la fin de chaque procédure.

L'usage d'animal entier est nécessaire pour que les effets comportementaux de l'administration d'antidépresseur puissent être observés, ainsi que l'enregistrement de l'activité électrique qui résulte de l'intégration de nombreux signaux émis par une variété de régions cérébrales différentes. Les expériences d'électrophysiologie seront réalisées sur le rat et non pas sur la souris car compte tenu de la petitesse du cerveau de cette espèce, le nombre de cellules enregistrables est moindre et nécessiterait un plus grand nombre d'animaux.

Un nombre total de 180 rats et 120 souris sera utilisé sur une période de 5 ans. La variabilité inter-individuelle classique du vivant nécessite d'utiliser plusieurs animaux pour obtenir des résultats comportementaux fiables. Les plans expérimentaux tenant compte de la variabilité interindividuelle prévoient l'utilisation minimum de 15 rats par groupes selon le test statistique PS de Dupont et Plummer. Par contre, les expériences électrophysiologiques pourront être réalisées sur 10 rats seulement car les solvants des drogues peuvent être administrés avant les drogues chez le même animal. De plus, une étude pilote sera menée pour valider le modèle de dépression inflammatoire.

14711 La maladie de Parkinson est la deuxième maladie neurodégénérative en terme de prévalence, en résultant une incidence sociétale majeure dans nos populations vieillissantes. Comme la plupart des maladies neurodégénératives, l'origine de cette pathologie est complexe, combinant des prédispositions génétiques et un contexte environnemental. On sait également depuis peu que la dégénérescence des neurones ne dépend pas seulement de leurs caractéristiques propres, notamment un état de stress lié à des défauts d'activité mitochondriale, mais également d'une inflammation dans le cerveau des patients (activation des cellules immunitaires résidentes et infiltration de lymphocytes), qui amplifie le contexte délétère et la mort neuronale. Néanmoins, le rôle exact des différents types cellulaires et de leurs interactions dans le développement de la maladie reste peu connu. Ceci pourrait expliquer le manque d'efficacité des thérapies proposées actuellement qui, en plus d'être souvent invasives, ne permettent que de ralentir l'évolution de la pathologie.

Un point commun aux neurones dégénératifs et aux cellules neuroinflammatoires dans la maladie de Parkinson est une modification de leurs activités métabolique et transcriptionnelle. Dans ce projet, nous souhaitons étudier l'impact de facteurs de transcription sensibles au stress cellulaires et contrôlant l'expression de nombreux gènes du métabolisme et de la survie cellulaire, à la fois dans les neurones et les cellules immunitaires au cours du développement de la maladie de Parkinson. Nous possédons pour cela des lignées de souris déficientes pour ces facteurs de transcription. Nous espérons ainsi proposer de nouvelles pistes thérapeutiques ciblant à la fois la mort neuronale et la neuroinflammation dans cette pathologie.

Afin d'améliorer la robustesse de nos résultats, nous souhaitons utiliser 2 modèles de la maladie de Parkinson induits chez la souris l'un reproduisant les origines environnementales de la maladie, l'autre lesd origines génétiques. Nous étudierons à la fois la mort neuronale et la neuroinflammation

chez les animaux déficients soumis à ce 2 modèles et analyserons les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués *in vivo* et *ex vivo* (cultures primaires).

Ainsi, le recours à l'utilisation de souris est indispensable à notre étude. Pour l'ensemble du projet, il est prévu d'utiliser un maximum de 3020 souris en 5 ans et d'appliquer la règle des 3R comme suit

1- Remplacement. La force de ce projet est de pouvoir faire une analyse exhaustive des fonctions métaboliques et des interactions cellulaires chez l'animal au cours du développement de la pathologie. Le recours à des expériences *in vitro* ne permettent pas d'appréhender l'intervention temporelle des différents types cellulaires impliqués, ni d'en définir l'état métabolique en situation. De plus, les interactions cellulaires et la régulation métabolique fine de ces cellules ne peut être compensée par l'utilisation de lignées cellulaires immortalisées. Néanmoins, une fois que nous aurons validé ces points chez l'animal, l'analyse des mécanismes moléculaires sera approfondie à partir de cultures primaires de neurones, de microglie et de lymphocytes.

2- Réduction. Nous planifions chaque expérience pour minimiser le nombre d'animaux tout en permettant une analyse statistique fiable de nos résultats. Les modèles d'induction de Parkinson choisis ont été déjà validés par nous mêmes et nos collaborateurs et nous savons que des groupes de 5 souris sont en général suffisants pour pouvoir exploiter les résultats. Chaque fois que cela sera possible, nous analyserons un maximum de paramètres cellulaires et moléculaires sur les mêmes individus afin de limiter le nombre d'expériences *in vivo*.

3- Raffinement. Le bien-être des animaux sera suivi tout au long de nos expériences et fait l'objet de procédures strictes. Les souris seront toujours hébergées en groupes dans des cages de surface suffisante, avec alimentation et eau *ad libitum*. Une procédure est mise en place en accord avec le comité de suivi du bien-être animal de notre établissement pour limiter la douleur, la souffrance ou l'anxiété de l'animal. Les cages sont systématiquement enrichies (coton pour le nid, tunnel) et les animaux surveillés quotidiennement, permettant de détecter toute anomalie. Un animal sera euthanasié s'il présente une prostration continue, une déshydratation ou une perte de poids supérieure à 20%. L'anxiété des animaux sera limitée par des périodes d'acclimatation à l'hébergement comme à la manipulation. La douleur liée à l'expérimentation sera limitée par l'utilisation systématique d'analgésiques et sous anesthésie générale. De plus, les responsables du projet ont été formés à l'utilisation des animaux à des fins scientifiques et garantissent de la formation et l'encadrement des autres expérimentateurs impliqués dans les procédures expérimentales. L'apprentissage et la maîtrise des gestes techniques sont reportés dans les livrets de compétences des personnes concernées.

14712 Les plaquettes sanguines jouent un rôle vital pour arrêter les hémorragies en cas de blessures ou de lésions. Quand le taux de plaquettes circulantes chute en dessous de 10.000 plaquettes par μL de sang chez un patient, le risque d'hémorragie interne devient important. Les plaquettes sont continuellement produites dans la moelle osseuse à partir de cellules précurseur géantes, les mégacaryocytes (MKs). Afin de libérer les plaquettes dans la circulation sanguine, les MKs doivent traverser la paroi de microvaisseaux sanguins, les sinusoides. Les mécanismes moléculaires qui conduisent à ce processus ne sont pas encore compris. En particulier, on ne sait pas si une dégradation enzymatique est nécessaire pour créer un passage dans la barrière sinusoidale. Ce projet aura des retombées importantes car l'intravasation des MKs conditionne directement l'efficacité de production des plaquettes circulantes.

Objectif Comprendre comment les MKs traversent la barrière des sinusoides pour libérer des plaquettes sanguines dans la circulation sanguine. Cette étape ne peut pas être reproduite *in vitro* d'où la nécessité d'utiliser des modèles animaux. Ce projet comporte deux axes menés conjointement 1. Identifier les molécules importantes dans le passage des MKs au travers des sinusoides 2. Déterminer si une dégradation enzymatique est nécessaire pour créer des voies de transit.

Trois groupes de souris seront analysés 1. Souris transgéniques pour déléter des protéines connues pour être importantes dans la transmigration versus souris contrôles, 2. Souris ayant reçu

une injection d'anticorps bloquant (ciblant des protéines impliquées dans la transmigration) ou le solvant, 3. Souris ayant reçu une injection d'inhibiteur permettant de bloquer la dégradation enzymatique ou son solvant. Aucun effet secondaire n'est attendu suite aux injections de cet inhibiteur et des anticorps bloquants, mais les animaux seront surveillés pendant et suivant cet acte.

Ce projet sera mené en conformité avec le principe des 3Rs

Remplacer La compréhension des mécanismes d'intravasation des MKs repose sur un nombre très limité d'études *in vitro*. Ces modèles ne sont pas physiologiquement cohérents parce qu'ils ne reproduisent pas la complexité de la moelle osseuse. Les expériences *in vivo* sont nécessaires pour bien comprendre la totalité des processus engagés lors de la formation des plaquettes sanguines.

Réduire Les études d'imagerie présentent l'avantage d'utiliser des échantillons de petites tailles (1mm³). Ainsi, afin de réduire le nombre d'animaux nécessaires, plusieurs approches d'imagerie seront appliquées à la même souris. De plus, les nombres d'animaux utilisés lors des expériences seront minimalisés, avec la contrainte d'obtenir des données statistiquement significatives.

Raffiner Les conditions d'environnement sont optimisées par l'enrichissement des cages avec du coton et de la frisure pour permettre aux souris de construire des nids comme dans la nature, ce qui leur permet de compartimenter leur environnement selon leurs besoins. Elles ont un accès permanent à l'eau de boisson et à la nourriture. Avant l'injection rétro-orbitaire, les souris sont anesthésiées au vetflurane® et maintenues au chaud à 37°C sur une plaque chauffante thermostatée. Une goutte de tétracaïne, un collyre anesthésique local sera également appliquée sur l'œil de l'animal une minute avant l'injection. Une fiche de suivi est mise en place pour surveiller les animaux tout au long du processus de traitement. Une attention particulière sera apportée au niveau des sites d'injection des substances (anticorps bloquants, inhibiteurs) pour s'assurer qu'il n'y a pas d'infections.

Au total, en incluant tous les génotypes et traitements, ainsi que les expériences préliminaires pour le choix des doses des inhibiteurs, nous prévoyons un maximum de 222 souris

14713 Le cancer de l'ovaire est un cancer de mauvais pronostic dont la prise en charge associe chirurgie et chimiothérapie. La thérapie photodynamique (PDT) est une voie de traitement qui pourrait être employée en complément de la chirurgie. La PDT antitumorale est une technique de traitement basée sur l'association de molécules photosensibilisatrices (PS) capables de se concentrer dans les cellules tumorales, et d'une lumière focalisée de longueur d'onde appropriée. Une nouvelle molécule a été synthétisée pouvant cibler en particulier les cellules du cancer de l'ovaire. Nous souhaitons donc réaliser un modèle *in-vivo* de cancer ovarien afin de tester l'efficacité d'une PDT basée sur cette nouvelle molécule. Dans un premier temps nous devons mettre en place le modèle et valider le développement de la carcinose ovarienne. Puis nous pourrions tester l'efficacité du traitement.

Afin de développer le cancer intrapéritonéal ovarien, nous injectons les souris femelles avec des cellules humaines du cancer de l'ovaire. Pour atteindre le stade cancéreux, le protocole devra durer 28 jours. A l'issue du développement du cancer, les souris subiront la thérapie photodynamique. L'évolution du cancer sera évaluée par imagerie pendant 3 semaines. D'autre part, les organes prélevés seront analysés par différentes méthodes pour évaluer l'avancée du cancer selon les différentes conditions de traitement. Sur cette période, les phénotypes attendus ne portent pas de risques invalidants.

La quantité de souris engagées dans ces expériences est calculé au nombre de 96. Ce protocole a été établi en suivant la règle des 3 R « Remplacer, Réduire, Raffiner »

-Le nombre des souris a été réduit de façon à obtenir une validation statistique des résultats.

-Le protocole a été raffiné en développant un suivi non dangereux des souris tout au long de l'expérience. Ce suivi sera complété par un suivi du bien-être des animaux en observant le poids des souris et leur comportement.

-A ce jour, il y a impossibilité de remplacer cette étude par un autre moyen pouvant reproduire la réponse physiologique complète de l'organisme suite au traitement photodynamique. Il faut noter à cet égard que l'effet de la PDT a été évalué *in vitro* sur des lignées cellulaires.

L'ensemble de ce projet fait l'objet d'un brevet. Ces résultats seront intéressants dans la mesure où ils permettront d'apporter une preuve de l'efficacité de la PDT pour le traitement du cancer intrapéritonéal de l'ovaire.

14714 Les désordres vestibulaires sont des pathologies liées en premier lieu à des atteintes du vestibule, organe de l'équilibration localisé dans l'oreille interne. Ces pathologies se caractérisent par des sensations de vertige, des déficits posturo-locomoteurs pouvant conduire à des chutes, des battements incontrôlés de l'œil, ainsi que des altérations cognitives (ex altération mémoire spatiale). Ils sont souvent accompagnés de nausées et de vomissements. Des déficits cognitifs plus ou moins prononcés accompagnent les désordres vestibulaires les plus sévères. Ces symptômes peuvent avoir des causes multiples, tels que des AVC, des infections ou des traumatismes de l'oreille, ou encore des atteintes ototoxiques. Ils peuvent aussi résulter tout simplement du vieillissement normal de l'oreille interne. La prévalence des désordres vestibulaires est importante puisqu'ils représentent 3 % de l'ensemble des pathologies chez les plus de 50 ans et près de 1 % des urgences hospitalières. La prise en charge thérapeutique des désordres vestibulaires associe approches pharmacologiques et traitement par physiothérapie. Les solutions pharmacologiques restent peu efficaces par manque de spécificité.

Le présent projet propose de tester chez le rongeur, le potentiel bénéfique d'un composé pharmacologique sur les déficits posturo-locomoteurs et les déficits cognitifs induits par atteinte vestibulaire uni et bilatérale. Des lésions vestibulaires de nature ototoxiques seront générées chez le rat adulte par administration transtympanique d'arsanilate (TTA). L'évaluation des déficits posturo-locomoteur et des déficits cognitifs sera réalisée par adaptation des procédures préalablement détaillées. Aucun test *in silico* ne peut à l'heure actuelle se substituer aux tests sur modèles animaux de désordres vestibulaires.

Un total de 64 rats jeunes adultes sera utilisé pour cette étude. Les données recueillies au cours de cette étude permettront de déterminer la potentielle orientation de la molécule testée vers la voie de développement d'un nouveau composé pharmaceutique pour le traitement des symptômes des désordres vestibulaires. Afin de répondre à la règle des 3R, les expérimentations seront réalisées sur des rats des deux sexes et les animaux seront réutilisés pour chacune des trois procédures. Une période d'acclimatation d'une semaine sera appliquée avant début des tests. La TTA sera réalisée sous anesthésie isoflurane. Après la TTA, les animaux sont capables de se déplacer dès le deuxième jour post lésionnel, à ce délai ils sont tout à fait capables de boire de manière autonome. Dans notre étude, nous réaliserons systématiquement une injection de sérum physiologique afin de suppléer au déficit d'hydratation qui pourrait survenir dans les 24h après la lésion vestibulaire. Pendant la période de 24h après TTA les animaux seront hébergés 1 par cage et feront l'objet d'une surveillance quotidienne par le porteur du projet ainsi que les zootechniciens.

14715 Le cancer de l'ovaire, cinquième cause de décès liés au cancer dans le monde, est la principale cause de décès parmi les cancers gynécologiques. Ce cancer est responsable de plus de 140 000 décès dans le monde chaque année. Sa forme la plus commune est le cancer épithélial de l'ovaire (CEO). Ce cancer est généralement diagnostiqué à un stade avancé et représente plus de 95% des tumeurs malignes de l'ovaire. La chirurgie suivie d'une chimiothérapie à base de platine constitue le traitement standard actuel. Cependant, cette approche n'est pas toujours efficace pour améliorer la survie des patientes.

Bien que les CEO soient souvent hautement chimio-sensibles et qu'une rémission soit observée chez la plupart des patientes, jusqu'à 80% des patientes rechutent à cause de développements de résistances à ce traitement. Le pronostic reste médiocre pour les personnes atteintes de CEO récidivantes et / ou résistantes à la chimiothérapie au platine, sans option thérapeutique curative.

La complexité biologique et génomique des CEO a conduit chercheurs et cliniciens à explorer des stratégies ciblées et plus adaptées pour éviter la cytotoxicité des molécules utilisées en

chimiothérapie. L'ensemble des tentatives thérapeutiques n'ont pas conduit à des résultats concluants.

Depuis une quinzaine d'années, notre groupe de recherche s'intéresse à l'étude d'une famille de protéines, les prokinétines, en particulier la protéine EG-VEGF (Endocrine Gland derived Vascular Endothelial growth Factor). Cette protéine est exprimée spécifiquement dans les tissus endocrines (ovaire, testicule, cortex surrénal, placenta) où elle agit sur les cellules endothéliales.

Nous travaillons actuellement, dans des systèmes *in vitro*, sur les cellules issues du cancer de l'ovaire humain (cellules SKOV3 et OC314). Nous souhaitons néanmoins développer un modèle animal du cancer de l'ovaire afin d'évaluer l'efficacité *in vivo* de nos traitements. En effet, le recours à un organisme entier vivant est indispensable pour observer et comprendre la progression d'une tumeur dans son environnement physiologique pour la mise au point des traitements efficaces et leur évaluation.

Le développement du modèle consiste à implanter des cellules SKOV3 et OC314 dans les trompes de fallope de souris immunodéficientes. La souris a été choisie comme modèle pour notre projet parce qu'elle développe un cancer similaire à celui de la femme. Nos données préliminaires *in vitro* ont démontré une modulation du caractère tumoral des cellules SKOV3 et OC314 suite à un traitement bloquant les récepteurs de l'EG-VEGF.

Les cellules qui seront implantées dans les trompes de Fallope seront dotées d'un marqueur bioluminescent (Luciférase). Le développement tumoral pourra être ainsi suivi en imagerie (technique non invasive) sur plusieurs jours, notamment l'apparition des métastases dans le péritoine, les poumons et le foie. Des protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux. Les modèles animaux seront euthanasiés une fois les métastases bien établies. Nous envisageons dans un deuxième temps de traiter les souris avec des facteurs anti-angiogènes (facteurs empêchant la formation de vaisseaux impliqués dans le développement d'une tumeur), afin de valider leur potentiel thérapeutique.

Au total nous envisageons d'utiliser 270 souris élevées dans nos installations à des fins scientifiques. Ce nombre a été calculé au plus juste pour obtenir des résultats statistiquement significatifs.

Les animaux sont hébergés en groupe dans un environnement enrichi

Des critères d'arrêt ont été définis afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus, pour lesquels il sera décidé de mettre en place un traitement approprié ou une euthanasie.

14716 Les maladies inflammatoires sont un problème de santé publique majeur à l'heure actuelle. Elles désignent la présence d'une inflammation pouvant toucher les grands appareils du corps humain comme le système digestif, le système nerveux, l'épiderme, les articulations. Ainsi la maladie de Crohn, la maladie d'Alzheimer, l'atopie ou bien encore les rhumatismes sont des exemples de maladies inflammatoires. L'inflammation est à l'origine de ces pathologies. Mécanisme normal de défense de l'organisme face à une agression, l'inflammation permet d'apporter immédiatement sur les lieux de la réponse inflammatoire les agents chargés de lutter contre cette agression. Grâce à une réaction en chaîne très efficace et impliquant de multiples acteurs, l'agent déclencheur est éliminé et la réparation du tissu abîmé est entreprise. Malheureusement, dans certains cas, la réponse inflammatoire peut être exagérée et/ou ne parvient pas à se résoudre engendrant des maladies inflammatoires.

Les modifications physiopathologiques nécessaires au développement de l'inflammation sont très complexes et nécessitent la mobilisation d'effecteurs moléculaires et cellulaires nombreux. Il est impossible d'explorer l'ensemble de ces événements par une approche substitutive de culture cellulaire. Il est donc important de pouvoir disposer de modèles physiologiques pertinents pour permettre une recherche fondamentale et appliquée sur l'inflammation tout en évaluant l'efficacité de nouvelles molécules à visée thérapeutique.

Les modèles pratiqués chez la souris et illustrés dans ce protocole sont des modèles de référence dans les études portant sur l'inflammation. Nous induirons une inflammation du péritoine (péritonite)

par l'injection d'agent inducteur comme le zymosan, le TNFa et le thioglycolate. Un quatrième modèle consistera en l'induction d'une septicémie après ligation et perforation du cécum.

Dans le respect de la règle des 3R, et lorsque cela est possible ces candidats sont évalués sur culture cellulaire ou organe isolé préalablement aux tests animaux afin de remplacer ou de réduire le nombre d'animaux impliqués dans les protocoles. Nous utiliserons le nombre minimum de souris nécessaire à une analyse statistique en prenant en compte la variabilité inter-individuelle. D'autre part, un raffinement des protocoles sera effectué en fonction des avancées technologiques dans le domaine. Les souris sont hébergées selon les conditions de la nouvelle réglementation 2010/63 en unités individuelles ventilées de type III ou IV avec enrichissement de l'environnement (composants de nidification et igloo). Chaque animal entrant dans une étude disposera d'une fiche individuelle de suivi sur laquelle tout traitement et observation seront reportés. L'état de santé des animaux sera évalué quotidiennement selon des critères définis par l'Association française des sciences et techniques de l'animal de laboratoire (AFSTAL), d'apparence physique (perte de poids significative, gêne respiratoire) et comportementaux (souris prostrée, agressivité) définis en accord avec le comité de suivi du bien-être animal de notre établissement. Une dégradation trop importante de l'état de santé (au delà d'un score de 12 selon les critères détaillés dans les procédures expérimentales) pourra entraîner l'arrêt immédiat de l'expérimentation.

Dans ce cadre nous utiliserons un nombre maximum de souris, toutes procédures confondues, de 4100 animaux sur la totalité du projet.

14717 Le cancer est la deuxième cause de décès dans les pays développés après les maladies cardiovasculaires. Les traitements conventionnels de nombreux cancers tels que la radiothérapie, la chimiothérapie et la chirurgie ont démontré des limites d'efficacité nécessitant un besoin urgent de nouvelles stratégies thérapeutiques. Les virus oncolytiques sont une nouvelle classe d'agent thérapeutique pouvant être une alternative au traitement des cancers. Par définition, un virus oncolytique est un virus qui démontre une réplication et une lyse spécifique des cellules tumorales avec une faible voire aucune cytotoxicité sur les tissus dits « sains ». La perspective de ce projet est d'évaluer et de comparer, dans différents modèles murins syngéniques et de xéno-greffes humaines de cancers, différents virus oncolytiques exprimant des gènes thérapeutiques (virus « armés »). Les cancers ciblés correspondent aux tumeurs pour lesquelles il y a un fort besoin médical en clinique humaine. Sachant que le développement clinique de ces virus prévoit de les combiner avec de l'immunothérapie afin de potentialiser l'activité anti-tumorale, le projet se propose d'explorer dans les modèles murins les combinaisons de ces virus avec des traitements d'immunothérapie utilisés en clinique humaine pour le traitement de cancers de différentes origines. Le but de ce projet sera d'évaluer l'activité thérapeutique anti-tumorale des virus oncolytiques « armés » en association ou non avec de l'immunothérapie. Cette activité thérapeutique sera analysée dans une large variété de modèles de cancers murins et humains. Les résultats issus de ce projet permettront une meilleure compréhension des mécanismes d'activité des virus oncolytiques en association avec des substances anti-tumorales couramment utilisées en clinique. Les résultats permettront également de valider chez l'animal l'activité thérapeutique anti-tumorale de nouvelles générations de virus oncolytiques dans différents types de cancer.

Pour les expériences que nous mènerons nous serons vigilants à mettre en œuvre la règle des 3R -Réduire le nombre de souris utilisées avant d'être testés chez l'animal, les virus-candidats médicaments auront été évalués *in vitro* sur des modèles cellulaires de tumeurs humaines et murines établies et caractérisées, ainsi que dans des cellules primaires (non tumorales) pour sélectionner les virus candidats médicaments ayant une activité antitumorale et ne présentant pas de cytotoxicité. Nous prévoyons de mesurer l'effet bénéfique que pourrait apporter une « poly-thérapie » en combinant les substances anti-tumorales capable de potentialiser les effets oncolytiques de nos virus candidats dans nos modèles cellulaires. Différents tests statistiques seront appliqués (notamment les tests Mann Whitney et Log-Rank) afin de réduire au maximum le nombre d'animaux nécessaire à la réalisation de cette étude.

-Remplacer du fait de l'absence de système *in vitro* comportant tous les éléments pouvant interférer avec la réplication virale, et permettant de mimer leurs interactions et leur mode d'action, l'emploi

de modèles animaux est incontournable. Un nombre maximal de 6720 souris (immuno compétentes) est envisagé pour ce projet.

-Raffiner Tout au long de leur vie, une attention particulière est portée au bien-être des animaux en particulier par un enrichissement de leur milieu de vie qui leur permet d'assouvir les comportements liés à leur espèce. Les animaux sont hébergés en groupes sociaux pendant toute la durée des expérimentations, dans le but de préserver les interactions sociales entre congénères, avec eau et nourriture ad libitum. La réalisation par des techniciens rompus à ses manipulations garantissent la bonne reproductibilité des expériences et un suivi optimal du bien-être des animaux. Si nécessaire, un traitement antidouleur (de type anti-inflammatoire non stéroïdien) sera administré. Les effets dus au traitement seront surveillés et des critères d'interruption de l'expérimentation en fonction de l'aspect clinique des animaux (grille de score évaluant le volume tumoral, l'apparence de la tumeur, l'évolution pondérale, l'apparence physique général, le comportement) sont mis en place afin de limiter le stress et la souffrance des animaux.

14718 Les études expérimentales menées jusqu'à présent concernant les faibles gammes de doses de rayonnements ionisants sur le système vasculaire montrent une variabilité des réponses dues notamment à la pathologie vasculaire étudiée. De plus, les études épidémiologiques mettent en évidence un lien entre l'exposition aux rayonnements ionisants à des doses modérées (>500mGy) et le développement de pathologies cardiovasculaires notamment les pathologies cérébrovasculaires, de la circulation et ischémiques.

Les principales pathologies cardiovasculaires (infarctus du myocarde et accident vasculaire cérébral) sont liées aux complications de l'athérosclérose et sont suivies, en termes de fréquence, par l'anévrisme aortique. La majorité des études expérimentales sur les effets de faibles doses ont été menées dans le cadre de l'athérosclérose et ne montrent aucun effet délétère sur cette pathologie. Aucune étude n'a, jusqu'à présent, mis en évidence l'impact des doses faibles à modérées de rayonnements ionisants sur la pathologie anévrismale aortique.

Il existe deux types de pathologies anévrismales aortiques, l'une syndromique et l'autre dégénérative dont les mécanismes physiopathologiques sont différents. L'anévrisme syndromique est une maladie génétique liée à une anomalie qui aboutit à une fragilité, une dilatation et potentiellement une rupture de l'aorte. La maladie de Marfan est l'une des principales maladies aortiques syndromiques liée à une mutation du gène qui code pour la fibrilline. Elle provoque des anomalies osseuses et surtout une dilatation anévrismale de l'aorte ascendante avec un risque élevé de dissection et/ou de rupture. L'anévrisme de l'aorte abdominale est la pathologie non syndromique beaucoup plus fréquente qui touche essentiellement les sujets âgés ayant des facteurs de risque cardiovasculaires. La physiopathologie de l'anévrisme dégénératif est complexe et associe un certain nombre de mécanismes physiopathologiques.

Pour ce projet, nous allons utiliser deux modèles animaux complémentaires. Tout d'abord des souris déficientes en fibrilline (afin de mimer la maladie de Marfan). Ces souris ont un modèle accepté et reconnu du syndrome de Marfan avec une forte corrélation du génotype avec le phénotype. Elles présentent les caractéristiques morphologiques typiques du syndrome et elles peuvent mourir de dissections spontanées des anévrismes de la racine aortique. L'autre modèle, qui est également largement reconnu et utilisé, est le modèle de souris transgéniques ApoE^{-/-} sur lesquelles des mini-pompes sont implantées afin d'induire une hypertension conduisant à l'anévrisme. Les souris ApoE^{-/-} développent spontanément des plaques d'athérosclérose. Les doses d'angiotensine II ne modifient pas la pression artérielle, le taux de cholestérol ou sa distribution, mais elles augmentent la gravité des lésions athérosclérotiques aortiques en faisant un modèle pertinent pour l'étude de l'anévrisme. Ces deux modèles vont nous permettre d'explorer l'impact d'une exposition externe sur le développement des anévrismes, afin de déterminer si ceux-ci ont un effet protecteur ou un effet promoteur.

Ce projet prévoit l'utilisation de 400 souris sur 5 ans.

L'objectif de notre étude est d'évaluer par des approches *in vivo* et *ex vivo* la réponse des doses faibles à modérées sur les différents types de pathologies anévrismales est-ce que l'exposition externe aux rayonnements ionisants potentialise une pathologie anévrismale ?

Afin de faire ce travail, l'utilisation d'animaux est nécessaire car nous voulons connaître l'effet de rayonnements ionisants sur une pathologie à l'échelle de l'organisme entier. Dans ce cas, l'étude sur les cellules n'est pas suffisamment représentative d'un organisme intégré et ne peut mimer une pathologie globale.

Un nombre suffisant d'animaux est utilisé afin d'avoir une puissance statistique suffisante et des résultats exploitables.

Les procédures utilisées suivent la réglementation afin de limiter l'impact sur le bien-être des animaux suivi des animaux avec établissement de points-limites précoces, chirurgie sous anesthésie générale avec prise en charge de la douleur.

14719 Titre du projet Etude de molécules anticancéreuses chez des souris.

Durée du projet 3 ans

Mots clés modèles de cancer, sensibilité au traitement, nouveaux traitements

Type de recherche recherche appliquée

Buts du projet Un nombre croissant d'observations réalisées chez les patients suggèrent que le système immunitaire joue un rôle important dans certains types de traitements du cancer. Ce projet vise à étudier différentes nouvelles molécules pouvant avoir une activité anticancéreuse grâce au système immunitaire. L'utilisation de souris immunocompétentes, c'est-à-dire dont le système immunitaire est intact, nous permettra de déterminer le rôle du système immunitaire dans l'effet antitumoral. Ce rôle peut être particulièrement important dans le cas de traitements par des anticorps.

Retombées attendues Cette étude permettra de mettre au point de nouveaux traitements impliquant le système immunitaire.

Type d'espèces et nombres d'animaux cette étude sera réalisée sur souris immunocompétentes avec un effectif total prévu de 1904 souris

Prise en compte des 3 R a) remplacement cette étude cherche à étudier l'effet du système immunitaire sur la tumeur et doit donc être réalisée sur un organisme entier b) réduction la mise au point du modèle sera faite sur le nombre minimal de souris nécessaire et la confirmation des résultats sera réalisée sur un nombre minimal d'animaux permettant de conclure de façon fiable c) raffinement Afin de respecter le bien-être animal, nous ajouterons des jeux type roues en plastique en plus du quotidien de l'animalerie. Avant la mise en place du protocole les souris seront acclimatées aux expérimentateurs du projet afin de limiter leur stress. Les animaux seront observés quotidiennement durant la durée de l'expérience afin de pouvoir réduire, supprimer ou soulager leur douleur ou leur détresse et ainsi améliorer leur bien-être.; toutes les précautions nécessaires seront prises pour détecter et minimiser la souffrance des animaux dans ce cadre, un antalgique ou analgésique sera également utilisé dans les procédures de chirurgie afin d'enrayer la douleur chez l'animal.

14720 L'augmentation de l'épidémie d'obésité dans le monde engendre l'augmentation de la prévalence du diabète de type 2. Dans cette maladie, les perturbations de la tolérance au glucose s'associent progressivement à la détérioration de la fonction des cellules Bêta pancréatiques. Plusieurs approches sont proposées aujourd'hui, comme la chirurgie bariatrique induisant une perte de poids et restaurant d'une sécrétion d'insuline. Cependant, des évidences directes de réversibilité du changement de la structure et de la fonction des îlots humains marquant la progression de la maladie de l'obésité au diabète manquent.

Un modèle de souris humanisé existe. Ces souris immunodéficientes (Swiss Nude) sont greffées avec des îlots humains, et permettent le dosage spécifique de l'hormone C-peptide humain. C'est en utilisant ce modèle, qu'une équipe a montré l'adaptation des îlots humains à un environnement obésogène (induit par la nourriture hyperlipidique).

Le but de l'étude est de savoir si la dysfonction (induite par l'obésité) des îlots humains est réversible. Cela pourra être réalisé en transplantant des souris avec des îlots humains et en les soumettant à un régime hyperlipidique puis en le remplaçant (après 10 semaines) par un régime "normal" (6 semaines supplémentaires).

Pour cette expérience, 135 souris immunodéficientes RAG2 KO seront utilisées.

Pour préserver le bien-être des animaux nous respecterons scrupuleusement la règle des "3R" :

- Remplacer : Aucun modèle *in vitro* ou *ex vivo* ou simulation ne peut actuellement remplacer l'animal dans ce domaine - Réduire : Nous avons réduit autant que possible l'utilisation de l'animal en conservant la possibilité d'obtenir une réponse statistiquement significative.

- Raffinement : les animaux seront hébergés et traités avec soin (nourriture et eau en illimité, visite quotidienne, cycle jour/nuit régulier), avec anesthésie et traitement de la douleur lors de la chirurgie. De plus, cette chirurgie est réalisée par du personnel formé et sensible aux règles d'éthique expérimentale.

14721 Un des enjeux de la pharmacopée est de découvrir de nouvelles molécules destinées à soigner l'être humain ou l'animal. Les produits naturels et synthétiques, d'une incroyable diversité moléculaire, sont des outils pharmacologiques essentiels pour la recherche fondamentale et représentent un réservoir unique de molécules aux vertus potentiellement thérapeutiques.

Néanmoins, aucun médicament ne peut exercer une activité thérapeutique, si son principe actif n'est pas capable de franchir des barrières biologiques complexes ou s'il est dégradé par des enzymes. Dans ce cadre, l'étude de l'index thérapeutique et de l'innocuité d'une préparation pharmacologiquement active est primordiale. Il s'agit de déterminer les doses à administrer afin d'obtenir la concentration sanguine permettant l'effet recherché mais également d'évaluer la dose à laquelle les premiers effets secondaires apparaissent. Ces études sont fréquemment réalisées sur des rongeurs. La détermination des paramètres pharmacocinétiques (temps nécessaire pour atteindre le pic plasmatique, temps de demi-vie, cinétique d'élimination du composé,) est réalisée à partir de prélèvements sanguins effectués à différents temps après l'administration du composé. Par ailleurs, il est également possible de déterminer la concentration du principe actif dans l'organe cible.

Ce projet vise à évaluer, *in vivo*, le comportement pharmaco-cinétique de nouvelles préparations pharmacologiquement actives dans le cadre de traitement contre certaines infections à *E. coli* responsables de pathologies graves pour lesquelles il n'existe aucun antidote. Ces bactéries produisant des toxines de Shiga sont pathogènes pour l'homme et sont responsables de diarrhées, de colites hémorragiques et du syndrome urémique hémolytique qui en est la complication majeure. Le recours à l'animal est ici indispensable car aucun modèle *in vitro* ou *in silico* ne peut aujourd'hui reproduire la complexité de la pharmacocinétique d'un composé chez le mammifère. Le rongeur est un modèle permettant une extrapolation aux conditions d'utilisation clinique chez l'Homme. Le projet prévoit le recours à 980 rongeurs au maximum, spécialement élevés à cette fin et provenant d'élevages agréés par des autorités compétentes. Ce nombre a été réduit au minimum tout en gardant la puissance statistique nécessaire à l'obtention de résultats exploitables.

L'application de critères d'arrêts et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe, selon les règles en vigueur dans l'animalerie, permettront de garantir leurs conditions de vie. Leur état de santé sera surveillé tout au long du projet, ce qui permettra au vétérinaire de l'installation d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

14722 CONTEXTE

Les fièvres hémorragiques virales (FHV) représentent un grave problème de santé publique dans les pays endémiques où elles sont responsables de milliers de morts. Ces pathologies, induites par des virus de classe 4, présentent de très forts taux de mortalité (jusqu'à 90% pour certains virus), une capacité de transmission inter-humaine très importante et aucun traitement existant. Les FHV peuvent être causées par différents virus, on peut citer les fièvres de Lassa, la fièvre de Crimée-Congo, ou encore Ebola, causant l'épidémie ayant sévi en Afrique de l'Ouest entre 2014 et 2016,

la plus importante jamais recensée à ce jour et qui a fait plus de 11 000 morts sur plus de 28 000 cas. La fièvre de Lassa est pour sa part endémique en Afrique de l'Ouest où elle provoque chaque année plusieurs milliers de décès. Dans les pays européens non confrontés directement à ces maladies, le principal risque est associé aux voyageurs ou expatriés de retour des pays endémiques et pouvant développer la maladie une fois rentrés chez eux. Il est donc impératif de pouvoir diagnostiquer très rapidement et rigoureusement ces maladies afin d'éviter une épidémie en France.

OBJECTIF

Le diagnostic de ces FHV est primordial pour éviter une épidémie en France, et est assuré par une structure accréditée. Il existe plusieurs techniques de diagnostic soit par identification virale; soit via la sérologie avec la détection des anticorps produits par l'Homme par les techniques ELISA. Pour tous les virus de classe 4 responsables des FHV, il existe très peu de kits commerciaux disponibles et les techniques de référence sont des techniques « fait maison ». Pour la technique ELISA, il n'existe notamment pas de kits commerciaux et le diagnostic est réalisé grâce à un protocole développé et validé depuis plusieurs dizaines d'années. Cet ELISA est un ELISA indirect qui nécessite des réactifs spécifiques permettant de confirmer la présence des anticorps humains anti-FHV dans le sérum d'un malade et impose notamment l'usage d'anticorps polyclonaux (ACp) spécifiques de chaque virus devant être diagnostiqué. Ces ACp sont produits par liquides d'ascite chez la souris. Le précédent stock de réactif (produit en 2005) arrive à son terme et nécessite désormais un renouvellement. En première intention et afin d'éviter l'usage de l'expérimentation animale, plusieurs techniques alternatives à la production de liquide d'ascite ont été testées depuis plusieurs années comme la production d'anticorps polyclonaux chez le lapin ou l'utilisation d'hybridômes et d'antigènes recombinants mais aucune n'a donné des résultats satisfaisants permettant de réaliser des tests diagnostiques fiables sensibles et polyvalents. L'objectif de cette étude est donc de reproduire, pour un panel de plusieurs FHV, le protocole de production de liquide d'ascite réalisé en 2005 afin de renouveler le stock d'ACp permettant la mise en œuvre de ces ELISA de référence qui sont indispensables en terme de santé publique pour la France.

TYPE DE PROJET/PROCEDURES/EXPECE ANIMALE/SORT DE L'ANIMAL

Ce projet est de type translationnel d'une durée de 5 ans afin de pouvoir produire, des anticorps polyclonaux dirigés spécifiquement contre une ou plusieurs souches de chaque pathogène de risque biologique de classe 4 impliqué dans des maladies à fièvre hémorragique virale, soient contre 13 souches virales. Afin d'anticiper toute émergence virale de classe 4 (nouvelle souche ou nouveau virus encore inconnu à ce jour) durant les 5 ans du projet, ce panel a été amené à un total de 15 souches virales.

Ce projet nécessite la réalisation de deux procédures qui seront répétées pour chaque virus d'intérêt.

- La procédure 1 pour la reprise *in vivo* de cellules tumorales par passages successifs sur la souris (adaptation des cellules tumorales à la souris pour éviter toute réaction immunitaire non spécifique une fois inoculées aux souris immunisées)
- La procédure 2 pour immuniser des souris spécifiquement contre chaque souche virale avec production d'anticorps par liquide d'ascite (épanchement liquidien induit par l'injection de cellules tumorales préalablement revivifiées dans la procédure 1)

Ce projet nécessitera un maximum de 144 souris, ce nombre a été réduit au minimum afin de pouvoir obtenir le volume d'ascite nécessaire et suffisant au projet 9 souris pour 16 conditions (15 souches virales + 1 contrôle négatif) pour la procédure 1 2 souris pour l'adaptation du sarcome par souche virale d'intérêt ou contrôle; procédure 2 7 souris/souche de virus d'intérêt ou contrôle donc $16 \times (2+7) = 144$ souris au total. L'espèce utilisée sera la souris de souche Swiss, reconnue bibliographiquement comme bonne productrice de liquide d'ascite. Les souris ne sont pas sensibles à l'infection par les virus de classe 4, elles restent asymptomatiques tout le long de la procédure donc les inoculations virales ne seront pas douloureuses pour les animaux contrairement à la production d'ascite, cette procédure est donc de classe modérée. Tous les animaux seront mis à morts à la fin des procédures.

Conformité avec les 3R

Le nombre d'animaux a été calculé pour réduire au maximum le nombre d'animaux tout en s'assurant d'avoir un volume de récolte d'ascite suffisant pour renouveler de manière pérenne le stock de réactifs de diagnostic. Dans la mesure du possible du fournisseur, les animaux seront des femelles anciennes reproductrices qui sont moins sensibles à la distension de la cavité abdominale (en partie responsable de la douleur provoquée par la production d'ascite) par leur gestation. Le suivi des animaux sera quotidien, avec des pesées régulières puis journalières à partir de la période de production d'ascite, soit à partir de J+7 post inoculation de cellules tumorales. Le bien-être animal sera suivi à l'aide d'une grille de scoring qui reprend les observations du comportement et tout animal atteignant un score limite ou un point limite évoqué dans le scoring sera mis à mort.

14723 Contexte scientifique

Les monocytes sont des cellules immunitaires (dites « globules blancs ») contribuant non seulement à l'entretien des tissus et aux réponses immunes en cas d'infection, mais également au développement de pathologies telles que les maladies cardiovasculaires, qui représentent la première cause de décès dans le monde. Malgré les progrès récents et la mise en place des médicaments visant à diminuer le mauvais cholestérol dans le sang, plus de 17 millions de patients décèdent de pathologies cardiovasculaires chaque année dans le monde. Récemment, l'inflammation est apparue comme une composante centrale contribuant au développement des maladies cardiovasculaires. Les monocytes sont connus pour jouer un rôle central dans cette inflammation, ainsi que dans la formation des plaques d'athéromes, qui bouchent les vaisseaux sanguins et causent les accidents cardiovasculaires. Toutefois, les mécanismes qui régissent ces phénomènes restent inconnus. Ce projet vise à identifier et valider de nouvelles voies nutritionnelles qui régulent les monocytes et l'inflammation liée aux maladies cardiovasculaires, et notamment le rôle des graisses dans ce phénomène.

Problématique : Le dérèglement des cellules immunitaires est souvent associé à la progression des maladies cardiovasculaires. La nutrition joue un rôle clé dans le contrôle du nombre de globules blancs générés ainsi que leurs fonctions. Nous nous intéressons particulièrement à la contribution des graisses dans ces processus. Le taux d'acides gras dans le sang est un facteur de risque pour le développement des maladies cardiovasculaires chez l'Homme. Celui-ci est régulé par divers facteurs tels que la prise alimentaire, le stress, ou encore le sommeil. Néanmoins, le rôle du tissu adipeux dans le contrôle des cellules immunes via la production d'acides gras au cours des maladies cardiovasculaires reste inconnu.

Hypothèse de travail : Nous allons tester l'hypothèse que le taux d'acides gras circulants impacte la production des globules blancs ainsi que leurs fonctions et ceci favorise le développement des plaques d'athérome. Nous voudrions déterminer si des facteurs environnementaux tels que le stress ou le sommeil sont impliqués dans ce processus. Pour répondre à cette question, nous utiliserons des souris génétiquement modifiées, dont le tissu adipeux est incapable de générer des acides gras. Ces souris seront comparées à des souris normales (dites « sauvages »). Les souris seront soumises à diverses conditions visant à moduler la génération d'acides gras par le tissu adipeux, telles que le jeun, le stress ou le manque de sommeil. En utilisant des modèles précliniques murins, nous chercherons donc à déterminer l'impact des acides gras sur le développement des plaques d'athérome, qui causent les accidents cardiovasculaires.

Justification du modèle et raffinement : Les maladies cardiovasculaires sont des pathologies complexes dans lesquelles de multiples voies nutritionnelles et physiologiques interviennent. Une approche *in vitro* de culture cellulaire n'est pas appropriée afin de répondre correctement aux demandes de cette problématique. Ainsi, des modèles murins athérogéniques ont été développés et validés par la communauté scientifique comme outils d'études précliniques intégrant la complexité de la problématique. Les procédures proposées sont basées à la fois sur une justification scientifique et tiennent compte du bien-être animal. D'autre part, l'utilisation de modèles murins est régie par la règle des « 3R »

- Réduction afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, nous utiliserons une approche statistique nous permettant de prévoir le nombre d'animaux nécessaires pour répondre clairement à notre question scientifique, sans utiliser plus de souris que nécessaires. De plus, nous utiliserons aussi bien les souris mâles que les souris femelles.

- Remplacement comme décrit précédemment, aucune méthode alternative *in vitro* ou *in silico* n'est adaptée afin de remplacer totalement le modèle murin. Toutefois, nous avons mis en place une approche utilisant la technologie d'édition génétique CRISPR-Cas9 permettant de remplacer partiellement ces modèles murins. Plus précisément, nous utiliserons cette technologie afin de modifier à façon le génome des cellules de moelle osseuse provenant de souris « sauvages » surnuméraires générées lors de croisement de souris hétérozygotes dans notre élevage. Ces cellules modifiées *in vitro* seront ensuite réimplantées dans nos modèles murins lors d'une procédure de transfert de moelle osseuse. Cette méthode de remplacement permettra d'éviter l'utilisation d'au moins deux lignées de souris supplémentaires.

-Raffinement la mise en place de points limites régissant le déroulement des procédures permet l'amélioration du bien-être animal afin de diminuer de façon optimale la détresse ou l'angoisse des animaux. Pour chaque procédure, nous avons pris en compte la gestion de la souffrance, l'angoisse et la douleur pour nos animaux. Notamment au cours de l'analyse par calorimétrie, de la litière sera déposée jusqu'au niveau de la grille de sol de la cage métabolique afin d'éviter aux souris une station directement sur le métal, et afin de leur permettre d'avoir accès à leurs fèces ce qui répond à leur besoin naturel de coprophagie. Des buchettes de bois seront mises à disposition des animaux nourris avec de la nourriture riche en graisse (nourriture molle) afin de répondre à leur besoin naturel de ronger. Lorsque cela est possible, la manipulation des souris se fera sous anesthésie et analgésie. Les cages contiennent de la litière permettant d'éviter le contact avec le plastique et sont enrichies avec un abri en plastique et du matériel de nidification. Les animaux auront libre accès à de l'eau et de la nourriture en dehors des procédures de mise à jeûn.

Perspectives

Cette étude pourrait ouvrir de nouvelles perspectives de traitement visant à diminuer la mortalité induite par les maladies cardiovasculaires. Afin de pouvoir générer des résultats robustes, nous avons calculé (test de significativité statistique) que 1038 souris devraient être utilisées et réparties sur une période de 5 ans. L'ensemble des procédures proposées dans ce projet sont connues comme non remplaçables par des procédures ne faisant pas intervenir directement l'animal.

14724 Avec le vieillissement des populations, le nombre de personnes âgées souffrant de maladies cardiovasculaires devrait augmenter en conséquence dans le monde entier avec une hausse des dépenses de soins associées.

L'artériosclérose désigne une dégénérescence fibreuse des artères qui deviennent plus épaisses et plus rigides. Elle s'accompagne fréquemment de dépôts de cholestérol (=athérome) sur la paroi interne des artères, notamment lors des hyperlipidémies (maladie athéromateuse) on parle alors d'athérosclérose.

Des preuves solides s'accumulent quant à une corrélation entre la vaccination antigrippale et la réduction des événements cardiovasculaires. La plupart des études sur ce vaccin ont constaté une efficacité en dehors de la période épidémique (période estivale) et en l'absence d'exposition au virus. Ces résultats ont conduit à considérer un effet propre du vaccin, une action « infection-indépendante ». Différentes hypothèses ont été avancées, au cœur duquel l'immunité vaccinale représente une piste de réflexion sérieuse. Nous suggérons que la vaccination anti grippale induit une réponse immunitaire soutenant cet effet protecteur porté par le vaccin.

Pour répondre à cette problématique, un modèle de souris a été sélectionné, modèle qui reflète plus fidèlement la maladie athéromateuse retrouvée chez l'humain et développe des lésions athérosclérotiques spontanées, exacerbées par un régime hyper-lipidique pendant 12 semaines. De plus, le système immunitaire de la souris et l'induction d'une réponse vaccinale sont suffisamment similaires au système humain pour permettre des comparaisons inter-espèces.

Avec ou sans vaccination, toutes les souris seront placées sous un régime hyper-lipidique pendant 12 semaines, favorisant ainsi le développement de l'athérosclérose. Nous réaliserons des investigations biologiques sur des échantillons sanguins afin de comparer les taux plasmatiques de différents biomarqueurs à des temps successifs. Cela permettra d'identifier les variations significatives attendues.

Au total, 48 animaux seront expérimentés dans ce projet sur une durée de 30 semaines.

Par souci de respect de la règle des 3R, les mesures suivantes ont été prévues

- Réduire au maximum les effectifs utilisés grâce aux données bibliographiques et du fournisseur. Le nombre total d'animaux est déterminé après analyse de données préliminaires les tests statistiques utilisent une analyse classique de variance (ANOVA) et des tests à postériori (Fisher, Tukey-Kramer) pour analyser les différences entre groupes expérimentaux. Pour les expérimentations réalisées en routine, ce nombre se base généralement sur les données déjà publiées. Il varie de 6 à 8 animaux par groupe expérimental.

- L'objectif de ce projet implique des investigations invasives de sévérité légère et un protocole difficilement réalisable chez l'humain puisque la vaccination antigrippale s'inscrit dans la stratégie thérapeutique des maladies cardio-vasculaires. L'absence de vaccination expose donc à un préjudice évident de perte de chance pour le patient. De plus, les événements séquentiels de formation de plaque chez les souris ApoE^{-/-}, sont considérablement similaires à ceux observés dans des modèles animaux plus grands (porcs et primates non humains), bien établis de l'athérosclérose et chez l'homme.

- Remplacement Le projet met donc en jeu des explorations fonctionnelles sur animal vigile qui ne peuvent pas être substituées par des approches *in vitro*.

- Nos résultats permettront de caractériser l'activité des anticorps vaccinaux afin de déterminer le ou les mécanismes d'action les plus pertinents à étudier chez l'Homme. Ce travail est une étude préliminaire indispensable à l'élaboration d'une étude clinique avec recrutement d'une large cohorte de sujets âgés pour étayer la pertinence du mécanisme identifié préalablement chez l'animal.

- En termes de raffinement, il a été choisi chaque fois que possible

- o Des procédures le moins invasives possible (prélèvements biologiques)

- o Des mesures d'habituation des animaux Les animaux seront manipulés dans le calme, tant pour les vaccinations que pour les prélèvements sanguins. Des récompenses seront administrées à la fin des procédures et une période aussi bien d'acclimatation que d'habituation au geste sera réalisée avant le premier prélèvement sanguin. La douleur potentiellement ressentie est fugace.

- o Suivi des animaux Chaque jour, les animaux seront évalués pour leur bien-être et des dispositions en cas de douleur ou souffrance seront prévues.

14725 Le mélanome malin cutané est la forme la plus agressive des cancers de la peau. Aujourd'hui, le seul traitement efficace reste la chirurgie pratiquée à un stade précoce car une fois disséminées, les cellules de mélanome deviennent résistantes aux chimiothérapies conventionnelles. Les espoirs apportés par l'essor des thérapies ciblées et immunothérapies ont été fortement nuancés par des cas de non-réponse ou rechutes rapides. Il est donc aujourd'hui crucial de développer de nouveaux traitements. Une molécule a été développée avec comme caractéristique d'inhiber les interactions d'une protéine impliquée dans une voie très fréquemment mutée dans le mélanome et très souvent réactivée dans le développement de résistance. Le but de cette étude est de démontrer l'efficacité de cette nouvelle molécule dans le traitement du mélanome et du mélanome résistant au traitement. De plus, il a été démontré qu'une partie de l'effet de cette molécule est due à sa capacité à activer le système immunitaire, le but de ce projet est donc d'évaluer aussi l'intérêt de combiner cette molécule avec l'immunothérapie.

Remplacement Des expériences sur lignées cellulaires *in vitro* ont été réalisées au préalable, mais seul un modèle *in vivo* chez l'animal permettra d'étudier les interactions complexes entre les cellules tumorales et les cellules immunitaires.

Réduction Le nombre total de souris utilisées dans ce projet (n=720) a été réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement interprétables.

Raffinement Un personnel qualifié s'assurera du bien-être des animaux. Une surveillance attentive des animaux 2 fois par semaine sera réalisée tout au long des procédures pour assurer la détection précoce des points limites. L'expérimentation ne sera pas poursuivie au delà de l'apparition de signes évocateurs de mal-être ou de souffrance définis au préalable.

Ce projet inclut 720 souris.

14726 De nombreuses situations mènent à une perte de muscle importante telles que l'immobilisation, un style de vie sédentaire ou certaines pathologies. Cette perte de muscle se caractérise par une perte de la masse musculaire et de la fonction locomotrice, ayant pour conséquences une perte d'autonomie, des retards de récupération, et à terme des coûts de prise en charge élevés. Préserver la masse musculaire lors de périodes d'inactivité physique et améliorer la récupération musculaire sont donc un enjeu majeur de santé publique.

L'objectif général du programme de recherche est de développer des stratégies d'intervention pour lutter contre les pertes de protéines musculaires.

L'activation modérée de la voie eIF2a/ATF4 avant un stress permet de préserver la fonction tissulaire dans différents modèles pathologiques. L'halofuginone (HF) active cette voie et améliore l'histopathologie de souris dystrophique. Par contre, dans cette étude l'effet de l'HF s'exerce pendant le développement de la pathologie.

L'objectif de ce projet est de déterminer si une sollicitation maîtrisée de cette voie (pré-conditionnement, i.e. PC) en amont d'un stress permet de limiter la perte de fonction musculaire au cours d'une situation catabolique. Pour cela, le PC sera réalisé par l'administration d'HF avant une atrophie musculaire induite par l'inactivité physique en utilisant le modèle de suspension par le train arrière des souris. Il sera nécessaire au départ d'optimiser un protocole de PC (mode, dose, durée d'administration d'HF) pour préserver la fonction musculaire lors de l'inactivité physique.

L'efficacité du PC sera évaluée par la mesure de la fonction locomotrice, de la masse musculaire et des mécanismes responsables de l'installation de la perte de la fonction musculaire. Nous évaluerons également les paramètres qui contrôlent la masse et la fonction musculaire, i.e. le métabolisme protéique musculaire, les réserves énergétiques intramusculaires, l'activité de l'ISR, les paramètres de l'homéostasie mitochondriale.

En pratique, le programme expérimental a été divisé en 5 tâches

1) Choisir la(es) dose(s) d'HF efficace(s) pour induire rapidement et transitoirement la voie eIF2a/ATF4. L'HF est déjà largement utilisé en clinique vétérinaire pour d'autres applications et s'est avéré d'une utilisation très sûre pour les animaux.

2) S'assurer que la mesure de locomotion après la suspension est compatible avec l'étude des mécanismes intramusculaires. Si c'est le cas, la tâche 5 ne sera pas nécessaire.

3) Mettre au point un protocole de PC efficace en testant des différentes doses-durées-fréquences d'administration de l'HF. Nous ne dépasserons pas une durée de PC de 3 mois. En cas d'impossibilité à identifier un protocole efficace les tâches 4 et 5 ne seront pas réalisées.

4) Déterminer l'impact du PC sur les adaptations précoces et tardives en réponse à la suspension et sur la récupération musculaire.

5) Etudier l'effet du PC sur les mécanismes intramusculaires en réponse à la suspension. Cette tâche ne sera pas réalisée si la tâche 2 indique que la mesure de locomotion après la suspension ne perturbe pas ces mécanismes.

Nous estimons que 2090 animaux seront nécessaires pour mener à bien cette étude sur 5 ans. Les dispositions prises pour l'application de la règle des 3R en accord avec la réglementation européenne 2010/63/UE seront les suivantes

- « Réduire » le nombre d'animaux en expérimentation

Pour nos expérimentations, nous avons prévu le nombre nécessaire d'animaux, à la fois pour garder une puissance statistique dans le traitement de nos résultats, et pour palier l'exclusion de certaines souris dans l'expérimentation.

- « Raffiner » la méthodologie utilisée, ce qui implique la notion de points limites

Comme développé pour chacun de nos protocoles expérimentaux, nous allons porter une attention particulière au bien-être des animaux. Le suivi quotidien des animaux permet d'identifier des signes de souffrance caractérisés par l'état du pelage, le comportement de la souris (agressivité / apathie), cris, mobilité, alimentation... Le poids corporel et la prise alimentaire seront donc mesurés tous les jours. Dans le cas où un animal présenterait des signes manifestes de souffrance ou une perte de poids excessive ($\geq 20\%$ du poids initial), il sera sorti des procédures expérimentales et euthanasié si les signes persistent dans les 24h.

- « Remplacer » les modèles animaux

Nos questions scientifiques sont centrées sur les effets des différents niveaux de contraintes environnementales sur la physiologie du système musculaire. Les expérimentations animales avec système intégré sont donc primordiales. Des modifications engendrées au niveau de l'organisme entier, telles que les modifications des sécrétions hormonales par exemple, influencent la cinétique de perte musculaire. De fait, nous nous sommes orientés vers un modèle animal pertinent pour la physiologie musculaire et avons choisi la souris en raison de l'intérêt des modèles transgéniques disponibles. Il n'existe pas de modèle cellulaire reproduisant nos procédures expérimentales.

Dans tous les protocoles expérimentaux, les animaux seront adaptés à leur environnement. Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité, par du personnel qualifié, pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. La douleur est rigoureusement contrôlée grâce à des points limites évalués en amont. Par ailleurs, les animaux sont hébergés dans un environnement enrichi pour améliorer les conditions d'hébergement.

14727 L'hibernation est une adaptation physiologique et comportementale qui permet la survie de l'espèce pendant les périodes saisonnières défavorables (température extérieure basse et pénurie des ressources alimentaires). Tout au long de l'hibernation, afin d'économiser de l'énergie, l'animal va alterner entre des phases d'hypothermie corporelle profonde, appelées torpeurs (faible besoin énergétique) et des phases de réveil avec un retour à la normothermie (régulation de la température corporelle autour de 37°C très consommatrice d'énergie). Des travaux suggèrent que cette adaptation physiologique de l'animal dépend de la production saisonnière de mélatonine qui, via une hormone, thyrostimuline (TSH), régulerait l'activité enzymatique des tanocytes, cellules tapissant la paroi du 3ème ventricule du cerveau. Les tanocytes sont connus pour réguler la physiologie saisonnière en modifiant le statut thyroïdien local de l'hypothalamus. L'objectif de ce projet est de déterminer si la régulation saisonnière de l'hibernation implique une modification des concentrations locales d'hormones thyroïdiennes dans l'hypothalamus. Cette étude sera réalisée chez un modèle de rongeur hibernant, le hamster syrien.

Des hamsters syriens mâles seront élevés en conditions expérimentales mimant l'été (jour longue et température ambiante à 22°C , que l'on nommera PL22) puis seront transférés en conditions d'hiver (jour courte et température ambiante de 8°C , que l'on nommera PC8) avec un système de mini-pompe délivrant en continu de la TSH, de la T3 ou une solution saline (contrôle). Les hamsters seront équipés de dispositifs permettant de suivre leur température corporelle tout au long de l'expérience et ainsi d'identifier si l'infusion de TSH et/ou de T3 altère l'occurrence des phases de torpeur et de réveil durant l'hibernation. Des prélèvements seront réalisés post-mortem à la fin de l'expérience (après 2 mois en PC8).

Pour réaliser ce projet, nous avons besoin de 108 hamsters syriens mâles distribués en 12 groupes de 9 animaux pour une durée maximale du projet de 5 ans.

Remplacement L'expérience doit être réalisée sur l'animal entier. Aucun moyen de substitution ne permet de modéliser les différentes étapes de l'hibernation et les processus liés à chaque étape

(intégrant des modifications métaboliques périphériques et des modifications de structures cérébrales, notamment l'hypothalamus).

Réduction Sur la base des connaissances acquises sur le modèle animal et sur les techniques utilisées, le nombre d'animaux nécessaire à l'étude a été établi au minimum requis ($n = 9/\text{groupe}$) pour obtenir des résultats statistiquement significatifs en utilisant des tests statistiques paramétriques et/ou non paramétriques.

Raffinement le hamster syrien est un animal agressif en PC8, les animaux seront placés en cages individuelles, mais en restant en contact olfactif et visuel avec leurs congénères. La cage est enrichie avec un bâtonnet de bois à ronger et de la frisure (meilleur matériel de nidation à 8°C). Le maximum sera fait pour réduire la douleur et le stress des animaux tout au long de l'expérience. Les procédures invasives envisagées seront réalisées sous anesthésie générale, analgésie et anti-inflammatoire, pendant laquelle la température corporelle est maintenue grâce à un tapis chauffant. Les animaux seront suivis pendant la semaine suivant la chirurgie. Afin de limiter la souffrance induite à l'animal, des points limites ont été définis permettant à tout moment d'exclure l'animal de l'étude.

De manière générale, ce projet apportera un approfondissement des connaissances sur la régulation de l'hibernation une des fonctions physiologiques saisonnières indispensables à la survie de espèces en hibernation.

14728 Le diabète de type 2 (DT2) est une pathologie multi-organe affectant 58 millions de personnes en Europe et 3,7 millions de personnes en France. Il s'agit également d'une maladie silencieuse. 22 millions de personnes restent non diagnostiquées en Europe (700 000 en France), car sa détection est souvent fortuite, alors que la maladie est déjà pleinement installée. Le principal défi concernant le DT2 se situe donc avant l'apparition des premiers symptômes cliniques. Ainsi, il est urgent de trouver de nouveaux biomarqueurs de l'installation et de la progression du DT2. La découverte actuelle de biomarqueurs est basée sur une approche de métabolomique non ciblée et sans a priori en utilisant des échantillons de sang veineux ou d'urine. Malheureusement, ces métabolites fournissent une vue globale et corps-entiers, offrant peu d'informations mécanistiques sur le métabolisme et la fonction des organes. Leur potentiel pour cibler les thérapies spécifiques à un organe est alors limité.

Dans ce projet nous cherchons des biomarqueurs (signatures métabolomiques) des dérives métaboliques spécifiques à certains organes survenant avant les premiers symptômes cliniques pour un meilleur phénotypage précoce de l'installation et de la progression du DT2.

Les animaux utilisés seront des mini-porc Yucatan mâles appareillés de 4 cathéters (artériel, portal, sus hépatique et cave inférieure). 60 animaux distribués en 4 lots seront utilisés. Les animaux seront alimentés avec 2 régimes différents un régime normal et un régime induisant le développement du DT2. Des prélèvements sanguins sont prévus au début (J0), puis ensuite à J30, J60, J90, J120, J150 et J180.

Le protocole proposé s'inscrit dans le respect de la règle des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement) pour l'expérimentation animale, réduisant au minimum le nombre d'animaux nécessaires pour la réalisation du projet. En effet, l'effet de l'âge sera suivi sur un nombre restreint d'animaux. Aussi, les animaux sont utilisés comme leurs propres témoins lors des cinétiques. Par ailleurs, les protocoles appliqués au projet sont adaptés aux interventions chirurgicales (pose de cathéter), avec une anesthésie générale et des traitements locaux visant à réduire l'impact des gestes invasifs. Cette étude visant à déterminer des marqueurs spécifiques des organes lors de l'installation du DT2 la dimension intégrant la complexité des interactions entre tissus et organes dans cette maladie métabolique est très importante, car elle ne se retrouve que chez les animaux vivants. L'utilisation d'animaux vivants est donc la seule option possible.

14729 L'obésité et le diabète de type 2 sont des maladies métaboliques en pleine expansion. Il est important d'en comprendre les mécanismes pour proposer des thérapies efficaces. Le recours à

l'expérimentation animale est indispensable dans ce cadre car il permet l'accès à un modèle physiologique intégré, seul modèle permettant l'étude du métabolisme et de ses dérégulations.

Au cours de ces dernières années, la régulation de la masse musculaire est apparue comme un élément important dans le contrôle du métabolisme. La protéine PXR (Pregnane X Receptor) pourrait jouer un rôle clé dans le contrôle de cette masse musculaire. En effet, les souris qui n'expriment pas cette protéine ont plus de masse musculaire que les souris normales, elles résistent au développement des troubles métaboliques lorsqu'elles sont nourries avec un régime riche en graisses et, elles ont des concentrations plasmatiques d'acides biliaires et de FGF15 (fibroblast growth factor 15, un facteur de croissance intestinal) très élevées. Ce FGF15 semble être au cœur de la problématique puisqu'il a été montré qu'un traitement au FGF15 diminue les troubles métaboliques chez les souris nourries avec un régime riche en graisses et qu'il est capable d'augmenter la masse musculaire chez les souris saines mais aussi chez les souris présentant un défaut de masse musculaire.

L'objectif de cette étude est de savoir si, à elle seule, l'absence de l'expression de PXR dans le foie peut reproduire ce qui a été observé chez les souris qui ne l'expriment pas dans tous les tissus c'est-à-dire hausse des taux plasmatiques d'acides biliaires et de FGF15, augmentation de la masse musculaire et résistance au développement d'altérations métaboliques sous régime riche en graisses. Répondre à cette question permettra de mieux comprendre les mécanismes par lesquels la protéine PXR et le facteur intestinal FGF15 contrôlent le métabolisme.

Pour répondre à cet objectif, des souris mâles exprimant ou non la protéine PXR au niveau du foie seront utilisées. Ces souris seront soumises pendant 16 semaines à une diète standard (SD) ou enrichie en lipides (HFD). Les répercussions sur la masse musculaire, le développement de l'obésité et les troubles métaboliques seront étudiées.

Il est important de préciser que les souris qui n'expriment pas PXR dans tous leurs tissus ne présentent aucun phénotype dommageable. Ainsi, le fait d'empêcher l'expression de cette protéine uniquement dans le foie ne va pas générer de phénotype dommageable. En accord avec la règle des 3R, les souris seront surveillées tous les jours afin d'identifier et de limiter tout risque de souffrance ou de mal-être.

Un effectif total maximal de 120 souris sera utilisé. Ce chiffre a été estimé au minimum nécessaire pour réaliser l'ensemble des analyses, satisfaire les études statistiques et tirer des conclusions permettant de répondre à la question scientifique posée.

14730 La maladie d'Alzheimer (MA) est la maladie neurodégénérative la plus fréquente avec près de 26 millions de personnes souffrant de la maladie dans le monde, et 106 millions de personnes devraient être diagnostiquées avec la maladie en 2050. Il est essentiel de développer des thérapies pour l'Homme, pour la santé de notre population vieillissante. Pour ceci, il est impératif d'identifier les mécanismes moléculaires et des circuits neuronaux de la dégénérescence. Ceci est possible avec la manipulation génétique et moléculaire *in vivo* chez des animaux de laboratoire. On sait que le peptide beta-amyloïde (A β), agent causal de la maladie, se lie au récepteur nicotinique $\alpha 7$. Cette interaction entraîne des modifications pathologiques dans une étape précoce de la MA. En plus, il existe des preuves significatives que la nicotine joue un rôle neuroprotecteur contre la MA chez l'Homme, et dans des modèles animaux les mécanismes de cette neuroprotection peuvent être établis. Par exemple, un traitement à court terme avec la nicotine réduit l'accumulation des plaques amyloïdes par 80%, et aussi restore le comportement cognitif de la souris.

Il est donc essentiel de développer des modèles *in vivo* adaptés à l'étude du rôle des récepteurs nicotiques dans la MA, ceci afin de comprendre leurs rôles, pour ensuite pouvoir intervenir avec des médicaments qui ciblent de façon spécifique les mécanismes pathologiques.

Bien que des systèmes *in vitro* permettent d'étudier l'interaction directe entre la A β et le récepteur nicotinique, il est nécessaire d'étudier les conséquences de cette interaction dans l'animal *in vivo*, comme les troubles de la mémoire et les modifications moléculaires et cognitives qui sont les principales caractéristiques de la MA. Ceci n'est pas possible en culture.

Le but du projet est de développer des systèmes modèles pour pouvoir étudier cette interaction *in vivo*, comprendre les mécanismes impliqués dans la pathogénèse de la MA avec l'objectif final d'identifier des traitements efficaces. Ce projet comporte deux procédures, l'une classée en modérée et l'autre en sévère.

On propose d'utiliser une imagerie bi-photonique répétée chez le même animal. Ceci permettra d'observer des altérations de l'activité du cerveau dues à l'expression du peptide A β dans la même souris pendant le développement de la maladie. Ceci réduit de façon importante le nombre d'animaux nécessaires.

Les animaux seront surveillés chaque semaine pour s'assurer que la pose de la fenêtre d'observation reste intacte, qu'il n'y a pas d'inflammation, ou de douleur détectable. Les animaux seront entraînés à l'observation par le deux-photons durant quatre sessions afin de réduire le stress de l'animal.

Ce projet utilisera jusqu'à 350 souris sur 3 ans.

14731 Les modifications génétiques chez l'animal permettent de mimer certaines maladies humaines. Ce projet a pour objectif de produire des souris génétiquement modifiées à phénotype dommageable léger à modéré pour les différentes équipes de recherche travaillant notamment sur certaines maladies neurodégénératives, inflammatoires et/ou cardiovasculaires.

La lignée créée permet d'évaluer l'impact de la modification du gène d'intérêt sur un premier modèle vivant.

Les modifications génétiques peuvent induire des effets biologiques ou comportementaux, qui sont évalués en particulier par observations cliniques ou dosages sanguins (étape de Phénotypage). Une fois produites et caractérisées, les différentes lignées sont maintenues dans la zone d'élevage afin de fournir des lots d'animaux aux équipes de recherche.

Les souris sont accouplées en duos ou trios. Les portées sont génotypées. Une fois sevrés, les animaux sont transférés aux laboratoires destinataires des différents projets de recherche autorisés. Pour améliorer le bien-être de ces animaux, tout déficit apporté par un phénotype dommageable léger à modéré est compensé par l'adaptation du milieu environnemental (alimentation, enrichissement) ou donne lieu à l'application de critères d'arrêt anticipé spécifiques à chaque lignée. Les animaux disposent d'enrichissement physique dans les cages (matériel de nidification, tunnels ou dômes) pour faciliter l'expression des comportements naturels de l'espèce. Des contrôles sanitaires sont régulièrement effectués et l'observation quotidienne des animaux permet de s'assurer du bien-être de l'animal. Une équipe de techniciens formés et compétents est en charge de l'élevage de souris génétiquement modifiées et du génotypage/phénotypage.

Le nombre d'animaux utilisés est limité au strict minimum. Il est établi en relation avec le département de biostatistiques pour le phénotypage. L'ajustement et l'optimisation des plans de production aux commandes des unités de recherche permettent de garantir qu'un minimum d'animaux sera produit, contribuant ainsi aux objectifs de réduction du recours à l'animal (principe des 3R). Ce projet couvre un nombre maximal de 40 000 animaux sur 3 ans.

14732 Depuis plusieurs décennies, les méthodologies de création de souris génétiquement modifiées (ou souris transgéniques) permettent d'intégrer de façon stable un ADN exogène dans le génome de la souris et constituent un outil irremplaçable pour l'étude de la régulation et de la fonction des gènes chez les mammifères. Ces méthodes permettent l'introduction d'une très grande variété d'ADN étranger dans toutes les cellules de l'animal.

Une nouvelle technique de génie génétique utilisée pour la première fois chez la souris en mai 2013 (CRISPR/Cas9) permet d'obtenir des modifications génétiques avec une meilleure efficacité et dans des délais plus rapides. Cette approche utilise des molécules qui vont permettre de cibler, de couper et de réparer une séquence précise de l'ADN. Elle peut permettre la modification d'un gène endogène de la souris directement dans l'ovocyte fécondé alors que jusqu'à présent cette approche nécessitait l'utilisation des cellules Embryonnaires Souches (ES) et prenait presque une année. Notre groupe s'intéresse aux gènes impliqués dans les premiers jours du développement de

l'embryon de souris. Nous allons étudier les conséquences de modification(s) génétique(s) sur plusieurs gènes clés de cette période du développement. Le but de ce projet est d'utiliser cette nouvelle technique pour modifier plusieurs gènes de la souris. Par définition, ce projet ne peut être réalisé qu'*in vivo*. Les ovocytes fécondés micromanipulés sont obtenus de souris donneuses stimulées hormonalement et les animaux génétiquement modifiés sont issus du développement de ces embryons après leur réimplantation dans des souris « mères porteuses ». 9840 souris mâles et femelles, âgées de 3 semaines et 6-8 semaines seront utilisées sur 5 ans. Trois procédures expérimentales avec un degré de sévérité de classe légère seront mises en œuvre pour ce projet scientifique. Bien que cette procédure ne conduise à aucun dommage chez les souris, celles-ci seront quand même observées régulièrement pour détecter toute anomalie nécessitant une intervention pour garantir le bien-être des animaux.

Le but de ce projet est de définir une combinatoire de molécules pour cette stratégie de modification génétique qui soit la plus efficace pour obtenir la modification génétique souhaitée grâce à des approches dans l'embryon de souris *ex vivo*. La création de lignée de souris aura lieu dans un deuxième temps à partir des conditions expérimentales optimales définies sur l'embryon.

Le nombre d'animaux que nous estimons nécessaire pour ce projet repose sur notre expérience de la transgénèse « classique » et sur les données publiées de la technique de CRISPR/Cas9. L'efficacité de cette nouvelle technique dépend du gène, du choix et de la quantité des molécules utilisées. Ce projet permet de limiter le nombre de souris « mère porteuse » utilisées car seule les conditions expérimentales validées *ex vivo* seront utilisées pour produire des animaux génétiquement modifiés.

14733 Le développement de nouveaux traitements de type Host Directed Therapy (HDT) visant à manipuler directement le système immunitaire de l'hôte afin de lui permettre d'éliminer une tumeur ou une infection aiguë ou chronique est en plein essor. Ces nouvelles thérapies comprennent entre autres le développement de protéines recombinantes (anticorps ou cytokines), de stimulateurs non spécifiques de l'immunité innée, de petites molécules visant à interférer avec le métabolisme cellulaire.

Cette approche pourrait notamment permettre de rétablir la fonctionnalité du système immunitaire dans le cas d'immunosuppression, comme par exemple dans le cadre du sepsis. Le sepsis est une affection médicale sérieuse caractérisée par des réponses inflammatoires systémiques dérégulées en réponse à une infection, conduisant à un dysfonctionnement d'organes, concomitantes d'une phase d'immunodépression responsable d'une susceptibilité accrue au développement d'infections secondaires.

Le développement d'un nouveau traitement utilisant un vecteur viral comme carrier de molécules HDT pourrait permettre de traiter l'immunodépression induite par le sepsis en ciblant à la fois les cellules de la réponse immunitaire innée et adaptative. L'expression de ces molécules pourrait ainsi en être prolongée, présenter une distribution différente et engendrer une efficacité accrue, en comparaison à l'injection directe de ces molécules dans l'organisme.

Les deux vecteurs viraux sélectionnés ont démontré leur efficacité dans d'autres indications, mais sont classiquement administrés par voie intramusculaire ou sous-cutanée. Dans le cadre de ce projet, ces vecteurs seront injectés par voie intraveineuse pour permettre une expression systémique des molécules HDT. Etant donné qu'il existe peu d'information bibliographique sur l'utilisation de ces vecteurs par cette voie, l'objectif de cette étude est d'évaluer la biodistribution au sein de l'organisme de ces deux vecteurs viraux suite à leur injection par voie intraveineuse, et de caractériser les types cellulaires ciblés.

Règle des 3R Pour atteindre les objectifs de cette étude, il n'existe pas de méthode alternative à l'utilisation d'animaux vivants permettant d'estimer la distribution des vecteurs à l'échelle de l'organisme. L'injection des vecteurs aux animaux ne devrait pas induire de souffrance, et le prélèvement sanguin terminal sera réalisé sur animaux anesthésiés. Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet sera réduit au minimum et optimisé sans compromettre les objectifs de ce dernier.

Le nombre de souris nécessaires pour pouvoir analyser statistiquement les résultats est de 168 maximum.

14734 Le traitement du cancer de pancréas (adénocarcinome pancréatique) et du cerveau (glioblastome) ne permet pas chez la plupart des patients d'envisager une régression et une guérison de la maladie. Les taux de survie des patients atteints de ces deux cancers sont très faibles. Seule une petite proportion (<10 %) de patients atteints d'un glioblastome survivent au-delà de 3 ans. Dans le cas du cancer du pancréas lorsque le diagnostic est porté, la chance de survie à 5 ans est extrêmement faible et est estimée entre 1 et 5%. La recherche de nouvelles approches thérapeutiques est donc indispensable pour trouver de nouvelles pistes thérapeutiques qui reposent actuellement sur l'espoir de l'immunothérapie dont le but sera de stimuler le système immunitaire contre les cellules tumorales. Avant de passer à l'animal, la recherche de nouveaux traitements ont été étudiées sur les cellules tumorales de ces deux cancers en utilisant des modèles de culture *in vitro*. Néanmoins ces systèmes de culture n'ont jamais abouti jusqu'à présent à valider l'efficacité de ces approches d'immunothérapies anti-cancer pancréas et glioblastome. En fait, en absence du microenvironnement immunitaire complexe du pancréas et celui privilégié du cerveau, ces recherches thérapeutiques ne peuvent être testées qu'en utilisant des modèles expérimentaux chez l'animal. En effet, le modèle animal est recommandé pour modéliser ces tumeurs en fournissant les microenvironnements immunologiques spécifiques et mettant en jeu les propriétés anti-tumorales des réponses humorales créées par nos approches d'immunothérapies. Par la suite, valider de nouvelles immunothérapies chez l'animal est indispensable pour envisager un allongement de survie chez les patients atteints de ces deux types de cancer. Notre objectif principal est d'établir une réaction immunitaire contre des néo-antigènes tumoraux et de recruter les cellules immunitaires de défense au niveau de la (les) tumeur(s) et ainsi réduire la progression du cancer et limiter son invasion et son potentiel métastatique. Pour se rapprocher de l'homme, deux lignées cancéreuses murines traçable avec la protéine G verte (GFP) seront utilisées pour reproduire les modèles d'adénocarcinome pancréatique (Pan02) et un glioblastome (GL261) chez la souris immuno compétentes. Les souris C57BL/6 seront donc utilisées dans ce projet pour pouvoir étudier le répertoire des cellules immunitaires qui sera impliqué dans la réaction anti-tumorale. Notre méthodologie s'est basée sur des publications décrivant de récents modèles *in vivo* du cancer du pancréas et du cerveau. Le choix de la souris C57BL/6 revient au fait que ces souris sont immunocompétentes, largement utilisés pour modéliser ces deux cancers solides *in vivo*. Les néo antigènes utilisés ont été validés sur leurs innocuités et l'absence de toxicité chez ces souris. Notre protocole est optimisé de façon à amortir la souffrance animale en fixant des points limites à l'avance. Nous respectons dans notre expérimentation la règle des 3R. Notre protocole d'immunothérapie et le nombre de souris nécessaire seront définis de façon à minimiser le nombre de souris et le nombre d'expériences non prioritaires. Nous estimons avoir besoin d'un nombre total de 320 souris C57BL/6 pour conduire notre étude et valider l'efficacité du traitement en terme de résultats significatifs. Dans une autre étape, les réponses immunitaires et l'identification des mécanismes thérapeutiques induites par nos produits d'immunothérapies seront évaluées *in vitro* après avoir isolé les cellules immunitaires infiltrant les tumeurs et les rates.

Notre modèle animal compare un groupe contrôle non traité à un autre groupe traité et sera mis en place de telle sorte à pouvoir prévenir l'évolution de la tumeur (mode préventif). Ce modèle moins agressif qu'un modèle curatif est donc en faveur de pouvoir minimiser la souffrance de l'animal. En outre, nous évaluerons la croissance tumorale par une technique d'imagerie de bioluminescence (IVIS) et nous pratiquerons une euthanasie pour diminuer la souffrance de l'animale. Respectant la règle de raffinement, le protocole serait arrêté entre J20 et J25 après l'implantation orthotopique des cellules tumorales. Les cellules seront injectées sous anesthésie générale dans des conditions aseptiques. Un analgésique sera utilisé post chirurgie pour 48h pour diminuer la douleur si elle aura lieu. Un suivi quotidien du poids des souris, de leur comportement aura lieu avec un suivi de la taille de la tumeur couplé à une imagerie pour surveiller la croissance et/ou l'invasion tumorale.

14735 La schizophrénie est une maladie psychiatrique chronique fortement invalidante qui se déclare généralement entre 15 et 25 ans. Sa fréquence (environ 1% de la population générale) et ses conséquences majeures sur la vie personnelle, sociale, et professionnelle des patients et de leur entourage en font un véritable enjeu médical et socio-économique.

Malheureusement, la connaissance des mécanismes physiopathologiques impliqués dans la schizophrénie reste limitée, notamment en raison de la complexité des interactions entre facteurs de risque génétiques et environnementaux sur le développement du système nerveux central (SNC) lors de sa formation in utero jusqu'à sa maturation à l'adolescence. Aussi, le taux de développement de nouveaux médicaments innovants pour la schizophrénie est faible et de nombreux symptômes restent encore insensibles aux traitements. Mieux appréhender l'impact de ces différents facteurs est un enjeu majeur dans la recherche de nouvelles thérapies et méthodes de prévention.

Dans le cadre de cette hypothèse, il a été suggéré que le cannabis pourrait agir en tant que facteur de décompensation d'une vulnérabilité qui aurait pour support une anomalie neurodéveloppementale précoce. Des études épidémiologiques, couplées à des études chez l'animal indiquent que des déficits en acide gras oméga-3 (normalement contenus dans une alimentation équilibrée) ont un impact négatif sur le bon développement cérébral du fœtus et de l'enfant et pourraient créer ainsi des anomalies cérébrales « prédisposantes ».

Ce projet propose d'étudier le rôle d'une carence en oméga-3 lors du développement du SNC et lors de la prise de cannabis à l'adolescence à l'aide d'un modèle animal afin de tester sa possible implication dans la physiopathologie de la schizophrénie. Cette étude qui nécessite une approche comportementale n'est possible qu'à l'échelle de l'organisme entier et ne peut être reproduite *in vitro* ni *ex vivo*.

Nous prévoyons d'utiliser 1272 rats sur 5 ans. Notre projet mettra en jeu des procédures de carence ou de supplémentation alimentaires, d'administration de substances pharmacologiques ainsi qu'une évaluation de comportements s'apparentant aux symptômes de la schizophrénie chez l'animal (interaction sociale, activité locomotrice, mémoire, anxiété). Ce projet s'effectuera dans le respect de la règle des 3R, en veillant au bien-être des animaux et en limitant leur douleur. Pour réduire le nombre d'animaux, nous avons estimé la taille des échantillons permettant une analyse statistique efficace des résultats grâce aux données collectées au cours d'expériences précédentes. Les animaux seront observés quotidiennement et évalués à l'aide de points limites bien définis.

Les résultats attendus permettront d'améliorer l'évaluation des risques de développer une schizophrénie chez les adolescents présentant des difficultés psychiques et d'adapter la prise en charge. Par ailleurs, la meilleure compréhension moléculaire et cellulaire du déclenchement de la schizophrénie permettra d'envisager des soins spécifiquement adaptés à ces sujets et à visée préventive.

14736 L'hypertension artérielle est la plus fréquente des affections cardiovasculaires, touchant un milliard de personnes à travers le monde. L'hypertension est un contributeur majeur de la morbidité et mortalité cardiovasculaire et tueait 9 millions de personnes par an (Panorama mondial de l'hypertension, OMS). Une hypertension artérielle est caractérisée par des valeurs anormalement hautes de pression exercée par le sang sur la paroi des artères. L'hypertension artérielle est diagnostiquée par des mesures de pressions supérieures ou égale à 140 mmHg pour la pression systolique (PAS) et supérieures ou égale à 90 mmHg pour la pression diastolique (PAD). L'hypertension est une pathologie systémique complexe et la cascade d'évènements contribuant au développement de l'hypertension bien que non totalement comprise, semble notamment impliquer une altération de la fonction endothéliale vasculaire, un déséquilibre la balance sympatho-vagale et des désordres de la fonction rénale. La complexité de cette pathologie ne permet pas de se restreindre à des études in-vitro et nécessite donc l'utilisation de modèles animaux afin de tester l'efficacité de composés anti-hypertenseurs. Le principal objectif de cette étude est d'évaluer, dans le cadre d'un contrat avec la société X, l'impact de différentes formulations du composé X sur le développement de l'hypertension artérielle chez la souris C57bl/6J ainsi que la biodisponibilité

plasmatique du composé. Les données obtenues au cours de l'étude devraient permettre à la société, de passer ensuite à une phase clinique et potentiellement de commercialiser ce composé. Dans cette étude 3 formulations différentes du composé seront testées et comparées à la pratique d'une activité physique volontaire chez la souris. En effet cette dernière est un traitement non pharmacologique actuellement reconnu pour ses effets antihypertenseurs. L'hypertension artérielle sera obtenue par ajout dans l'eau de boisson de N ω -Nitro-L-Arginine methyl Ester (L-NAME, 2mg/ml, environ 160-180mg/kg/day). Après une semaine d'habituation au système de mesure non-invasive de la pression artérielle à la queue, la pression artérielle sera ensuite évaluée une fois par semaine pendant 3 semaines. Les différents composés seront administrés per os quotidiennement. A la fin des 3 semaines, les souris seront sacrifiées et le sang prélevé. Afin d'obtenir des données fiables et reproductibles lors des mesures de pression artérielle, 12 souris par groupe (6 groupes) seront nécessaires, soit un total de 72 souris.

- Raffinement : Le protocole a été conçu pour limiter au maximum tout stress induit aux animaux (périodes d'acclimatation et d'habituation à la mesure de la pression artérielle). Les souris seront hébergées en cages collectives afin de maintenir le caractère social de l'espèce. Par ailleurs, les cages seront enrichies par l'ajout d'igloos et de matériaux de nidification. Enfin, un suivi journalier des animaux permettra une action rapide en cas d'atteinte des points limites établis.

- Réduction : Le nombre d'animaux utilisés a été rationalisé à partir de résultats préliminaires obtenus avec le même matériel et la même souche de souris. Le nombre de 12 animaux par groupe a été défini comme le nombre d'animaux permettant de mettre en évidence des différences statistiques significatives sur les paramètres étudiés.

- Remplacement : L'utilisation d'animaux à des fins scientifiques se justifie ici car il n'existe, à ce jour, aucune méthode de substitution *in vitro* permettant l'étude de la modulation de la pression artérielle par des composés à visés thérapeutiques.

14737 Les effets des radionucléides sur l'environnement sont peu documentés. Le tritium est un élément rejeté par les centrales nucléaires dans le cadre de leur fonctionnement normal. Une fois dans l'atmosphère, il peut se retrouver dans les écosystèmes aquatiques. Dans la continuité des travaux déjà réalisés, le but du projet est d'évaluer les potentiels effets toxiques du tritium sous forme de thymidine tritiée (se liant directement à l'ADN) et de glycine tritiée (se liant sur les acides aminés) sur les animaux aquatiques. Le poisson zèbre, *Danio rerio*, modèle très utilisé dans la recherche toxicologique, a été choisi pour cette étude. Les effets du tritium seront évalués sur les stades larvaires et les adultes. Plusieurs réponses physiologiques seront mesurées (immunotoxicité/inflammation, neurotoxicité, génotoxicité, malformations, reproduction, microdosimétrie et bioaccumulation dans l'organisme). Les réponses obtenues après contamination des poissons au tritium seront comparées à celles obtenues après irradiation de poissons à une irradiation gamma, de façon à acquérir des éléments de réponse sur l'efficacité biologique relative du tritium.

Ces études nécessitent l'utilisation d'animaux, afin d'évaluer au mieux l'impact sur la fécondité des adultes et la survie des larves. A ce jour, les outils *in vitro* disponibles ne permettent pas une telle évaluation.

Pour réaliser ces expérimentations, 30 femelles et 30 mâles seront utilisés afin de produire les 7770 larves qui seront contaminées jusqu'au stade 10 jours post fécondation, soit au total 7830 poissons. Rappelons ici que jusqu'à 5 jours post fécondation, les larves ne sont pas reconnues comme autonomes et donc sont exclues du champ d'application de la Directive. 300 femelles et 300 mâles adultes seront également utilisés afin d'étudier les effets sur la reproduction des poissons et sur les larves issues de poissons contaminés jusqu'à 10 jours post fécondation (2590 larves), soit 3190 poissons. Ce projet prévoit donc l'utilisation au total de 660 poissons adultes et 10 360 larves. Le respect des règles de remplacement, réduction et de raffinement seront appliquées. Les animaux seront hébergés en groupe dans des portoirs spécifiques qui permettent le suivi des paramètres d'ambiance (température, conductivité, pH). De plus, des observations quotidiennes seront

réalisées pour s'assurer du bien-être des animaux. Le nombre d'animaux retenus satisfait les exigences statistiques pour permettre l'obtention de résultats publiables.

14738 La Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD) est la maladie musculaire la plus fréquente chez l'enfant avec une prévalence d'environ 1 garçon sur 5 000 à la naissance. Elle est due à une mutation sur le gène *Dmd* situé sur le chromosome X qui code la protéine Dystrophine, indispensable au maintien de l'intégrité des fibres musculaires. L'absence de Dystrophine entraîne une fragilisation des muscles à chaque contraction et donc une dégénérescence musculaire progressive. La DMD se traduit dans un premier temps par une faiblesse musculaire importante des membres inférieurs, puis, la faiblesse musculaire atteint les membres supérieurs. L'atteinte du diaphragme entraîne également une défaillance respiratoire. Avec le progrès de la prise en charge multidisciplinaire, l'espérance de vie des patients s'est considérablement allongée. Cependant, l'apparition inéluctable d'une cardiomyopathie dilatée, entraînant une insuffisance cardiaque, reste responsable d'une majorité de décès des patients avant l'âge de 30/40 ans. A ce jour, la prise en charge symptomatique et préventive de la défaillance cardiaque reste insuffisante pour obtenir une stabilisation de la maladie et il n'existe aucune solution thérapeutique satisfaisante. Il est donc primordial de développer un traitement pour l'atteinte cardiaque chez le patient DMD.

Pour que l'évaluation pré-clinique d'une approche thérapeutique soit pertinente, il est nécessaire d'utiliser un modèle animal qui mime au plus proche le phénotype du patient. Jusqu'à ce jour, faute de modèle animal pertinent exhibant le phénotype cardiaque DMD, la recherche pour le traitement de la DMD s'est essentiellement concentrée sur le traitement de l'atteinte des muscles squelettiques. La génération récente d'un nouveau modèle animal de la DMD, le rat DMDmdx, donne un nouvel essor pour la recherche d'un produit de thérapie génique de l'atteinte cardiaque des patients DMD. En effet, celui-ci développe une cardiomyopathie comparable à celle observée chez le patient, contrairement aux autres modèles animaux de la DMD (chien GRMD, souris mdx). Il présente également l'avantage d'être facile et peu coûteux à élever, permettant d'inclure un nombre plus important d'animaux dans les études et donc d'augmenter la puissance statistique de celles-ci.

La thérapie génique est une des approches prometteuses pour le traitement de la DMD. L'efficacité thérapeutique passe par le transfert dans les muscles (squelettiques et cardiaque), à l'aide d'un vecteur viral recombinant dérivé du virus adéno-associé (AAVr), d'un gène thérapeutique. La très grande taille du gène de la dystrophine empêche son insertion complète dans un vecteur AAVr (capacité maximale d'encapsidation = 4,7kb). Cependant, un gène thérapeutique, copie miniaturisée du gène de la dystrophine humaine, a été développé et se montre capable de remplacer le gène déficient et de produire une protéine « micro-dystrophine » (MD1) fonctionnelle. D'autres gènes thérapeutiques compatibles avec cette contrainte de limite d'encapsidation semblent également prometteurs pour traiter l'atteinte cardiaque.

L'objectif de notre projet sera d'évaluer les effets de quatre produits de thérapie génique différents après administration intraveineuse sur le phénotype cardiaque du rat DMDmdx.

Lors d'une précédente étude nommée « Caractérisation exhaustive du rat DMDmdx, nouveau modèle animale de la Dystrophie Musculaire de Duchenne » (APAFIS #5996-2016070618053653v3), notre équipe a pu observer que l'atteinte cardiaque présentait un profil évolutif. On observe tout d'abord un processus d'hypertrophie du cœur associé à des dysfonctionnements de remplissage dès 2 mois suivi d'un processus de dilatation du cœur qui s'accompagne d'une dysfonction d'éjection entre 8 et 11 mois d'âge. Pour cette étude, il paraît donc pertinent d'évaluer l'efficacité des différentes stratégies thérapeutiques à deux stades d'avancement de la pathologie cardiaque. La réponse à cette question aura des conséquences potentielles sur le design des essais cliniques prévus ensuite chez l'Homme (âge d'injection des patients). Ainsi, nous avons choisi d'injecter des animaux à l'âge de 1 et 7 mois (stade précoce et stade plus avancé de la maladie).

Un nombre de 120 rats sera utilisé dans cette étude. Des groupes de 10 rats DMDmdx seront injectés avec chaque vecteur (4 produits de thérapie génique) et 10 rats DMDmdx ainsi que 10 rats témoins sains (WT) recevront une solution saline, et cela à 1 et 7 mois d'âge. Les animaux des

groupes expérimentaux et contrôles, seront suivis 3 mois post-injection. Des analyses exhaustives seront réalisées chez tous les animaux afin d'évaluer l'efficacité du traitement au niveau phénotypique (évaluation de la force musculaire et de la fonction cardiaque), mais aussi au niveau histologique.

Le nombre de 10 animaux par groupe est basé sur notre expérience précédente de protocoles de thérapie génique lors desquels nous avons pu obtenir des résultats cohérents et reproductibles dans des groupes de cette taille. Cela semble être un nombre minimal qui permette d'assurer la robustesse des résultats sans qu'il soit excessif en terme d'animaux à inclure. Une analyse statistique sera réalisée (tests non paramétriques de type Kruskal-Wallis).

Des protocoles d'anesthésie et d'analgésie seront mis en places en fonction des procédures expérimentales :

-Les injections IV du vecteur (veine pénienne ou veine caudale selon l'âge d'injection) seront réalisées sous anesthésie (Etomidate (Hypnomidate®) administré en intra péritonéal) après prémédication analgésique par injection sous-cutanée de Buprénorphine (Véteergésic®). Les prélèvements sanguins pré-injection seront effectués à l'occasion de cette anesthésie.

-Les échocardiographies 2D seront réalisées sous anesthésie (Hypnomidate® en intra péritonéal).

-Les tests d'évaluation de la force (Grip test) seront effectués sur animal vigile.

Les animaux seront hébergés selon la réglementation en vigueur avec enrichissement du milieu.

L'évolution de la maladie pouvant entraîner un déclin de l'état de santé (difficultés locomotrices, d'alimentation, respiratoires), l'état général de chaque animal sera surveillé de façon quotidienne par le personnel animalier pour estimer une éventuelle gêne ou douleur liées à l'expression clinique de la maladie. Ces observations seront automatiquement fournies à un vétérinaire. Un tableau de points limites (annexe 1) sera disponible.

14739 Le Toll-like-récepteur-3 (TLR3) est exprimé par les cellules immunitaires et épithéliales ainsi que tous les cancers épithéliaux. Le concept du TLR3 comme cible anticancéreuse existe depuis près de 30 ans, même si leur mécanisme exact n'est connu que depuis peu. En effet, l'activation de ce récepteur entraîne la mort spécifique des cellules cancéreuses (mais pas des cellules normales), ainsi qu'une inflammation ayant un effet antitumoral. L'ensemble de ces deux effets devant induire à terme une vaccination contre la tumeur.

Malgré cette efficacité clinique, aucun activateur de ce récepteur n'a jusqu'ici obtenu l'autorisation de mise sur le marché en raison de manque d'homogénéité (taille, structure et séquences), d'effets toxiques ou de manque d'efficacité. Une nouvelle famille de ligands de ce récepteur a récemment été découverte (dont le candidat médicament de cette étude), homogènes, actifs, spécifiques et très peu toxiques.

Une étude pilote, preuve de concept de l'efficacité de ce nouveau candidat médicament, a été menée récemment sur un modèle de cancer de la vessie avec des résultats très encourageants. Une espérance de vie moyenne allongée de plus de 6 fois par rapport au groupe control, dont plus d'un tiers de rémission totale ayant induit une vaccination contre la tumeur, le tout avec une très bonne tolérance du traitement.

Cependant, ces effets ont été démontrés en utilisant un protocole non optimisé, ni en termes de fréquences, ni en termes de doses, de façon à être transposables chez l'homme pour une future étude clinique.

Ce projet consiste donc à optimiser le protocole de traitement de ce candidat médicament pour une utilisation clinique, seul ou en combinaison. Il s'articulera autour de 5 procédures séquentielles.

-La première étape de ce projet sera donc d'optimiser les fréquences de prise de traitement par rapport à l'activité antitumorale et autovaccinale du candidat médicament, en comparant directement les effets de 3, 2 et 1 prises par semaine.

-La seconde étape de ce projet consistera à déterminer les doses efficaces en utilisant la meilleure fréquence déterminée dans la première étape.

-L'ensemble des expériences précédentes n'ayant été effectuées que sur des souris femelles (ayant des tumeurs réputées plus agressives), un protocole permettra de comparer directement les effets du sexe (hormones), sur le traitement, en utilisant les fréquences et doses préalablement déterminées, sur des groupes de souris mâles et de souris femelles.

-L'efficacité de ce candidat médicament pouvant être améliorée par une combinaison avec un anticorps les souris seront traitées avec le médicament candidat et l'anticorps. L'effet antitumoral direct et l'efficacité autovaccinale seront analysés

-Enfin, les effets antitumoraux et autovaccinaux du candidat médicament en monothérapie seront comparés à celui du traitement de référence (le B.C.G.). Ces effets seront également analysés en traitant les souris avec le candidat médicament et le BCG.

L'ensemble des 5 procédures du projet inclura au maximum 940 souris.

Tout au cours de ce projet, l'ensemble des précautions seront prises pour stresser au minimum l'animal.

- La « réduction » du nombre d'animaux sans mettre en péril une interprétation statistique des résultats sera respectée en utilisant les méthodes statistiques adaptées aux petits nombres. Chaque expérience concluante sera répétée au maximum une fois et si possible en l'intégrant dans les contrôles de l'expérience suivante.

- Le « Raffinement » sera respecté par la mise en place d'une définition précises de points limites précoces et prédictifs (avec un système de score élaboré grâce à l'étude pilote). Une surveillance adaptée des animaux 3 fois par semaine permettra d'éviter toute souffrance des animaux. Les actes chirurgicaux seront effectués sous anesthésie générale après administration d'un analgésique. De nombreuses analyses seront réalisées sur les différents prélèvements pour documenter et obtenir le maximum d'informations sur ces modèles précliniques.

- Ces expérience sur petits animaux ne peuvent pas être remplacées. Seul un modèle in-vivo sera à même de mimer l'efficacité antitumorale et autovaccinale de ce candidat médicament au cours des différentes étapes de la progression tumorale.

Ce projet s'inscrit donc dans le cadre de développement d'une application thérapeutique applicable chez le patient.

14740 1-objectif scientifique du projet

L'adénocarcinome pancréatique (ADK) est un cancer en constante augmentation qui devrait d'ici 2030 se classer comme le second cancer le plus mortel. Ce cancer est très difficilement pris en charge et son diagnostic souvent tardif ne laisse que peu d'opportunités de traitements thérapeutiques, conduisant les patients à moins de 5% de chance de survie à 5 ans.

L'ADK est associé avec une réaction stromale abondante qui peut compter jusqu'à 90% du volume tumoral. Le stroma est une réaction du tissu dans lequel la tumeur se développe. Le stroma est composé de protéines de la matrice cellulaire qui visent à isoler la tumeur. La mise en place du stroma a lieu très tôt dans le développement de la tumeur. Les recherches récentes ont montré le rôle clef du stroma dans la suppression de la réaction immunitaire contre la tumeur. Des recherches récentes ont pu identifier la surexpression d'une protéine dans le stroma des modèles murins de cancer pancréatique ainsi que chez l'homme dans le pancréas tumoral. L'implication directe de cette protéine dans la régulation de la réponse immune dans le pancréas a été montrée. Il est envisageable que cette protéine joue aussi un rôle important dans la rigidité décrite dans le cancer pancréatique. Il est fort probable que cette rigidité tissulaire générée pendant l'initiation et la progression tumorale joue un rôle essentiel dans la modulation de l'activité anti-tumorale. Toutefois la contribution exacte des propriétés mécaniques du microenvironnement stromale dans l'invalidation de la réponse immune anti-tumorale reste peu explorée dans beaucoup d'études concernant les cancers solides.

Grâce aux analyses génétiques à grande échelle, plusieurs mutations impliquées dans le cancer du pancréas ont déjà été identifiées chez l'homme (mutations Cre, Kras, p16, p53, ALK4 etc.). La

connaissance de ces mutations a permis la génération de modèles animaux transgéniques afin de comprendre la complexité de cette maladie.

Les objectifs maintenant sont 1) de comprendre l'impact des modifications structurelles et fonctionnelles du stroma tumoral sur la modulation de la réponse immune dans le cancer du pancréas. Pour cela, nous allons biopsier les tumeurs des souris afin d'analyser la composition du stroma et les cellules du système immunitaire qui infiltrent le stroma 2) de neutraliser *in vivo* la protéine stromale surexprimée et voir s'il existe un effet synergique avec des immunothérapies établies qui ont montré une efficacité limitée dans le cancer pancréatique jusqu'ici. Pour cela, les souris seront injectées par voie intrapéritonéale avec les anticorps thérapeutiques pendant 3 semaines et le bénéfice du traitement sera apprécié sur la biopsie des tumeurs en fin de traitement.

2-retombées attendues dans le domaine de la cancérologie

Les retombées de ces travaux devraient permettre une meilleure compréhension des mécanismes de la progression tumorale et la mise au point de nouvelles approches thérapeutiques afin de restaurer une réponse immunitaire efficace.

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

Afin de nous conformer à la règle des 3Rs (Remplacement, Réduction et Raffinement), le nombre de souris nécessaires à nos travaux a été réduit au maximum sans compromettre l'interprétation statistique de nos résultats.

En raison de la nature complexe de ces recherches, qui visent à comprendre les interactions cellulaires au sein du pancréas et de différents organes affectés par sa dysfonction, nous ne pouvons malheureusement pas remplacer l'utilisation de modèles murins par des outils cellulaires ou des approches *in vitro*. Une partie de nos travaux consistera néanmoins à essayer d'établir des lignées cellulaires visant à limiter l'utilisation d'animaux.

Afin de limiter la souffrance inutile nous mettrons en place une surveillance adaptée et individuelle des animaux en court d'expérience afin d'assurer leur suivis et l'obtention d'un maximum d'information sur chaque souris analysée.

4-Nombre total d'animaux inclus dans le projet

L'ampleur de notre projet nécessitera toutefois l'utilisation d'un maximum de 1110 souris sur une période de 5 ans afin de pouvoir répondre à l'ensemble des points expérimentaux que nous souhaitons adresser.

14741 La maladie rénale chronique (MRC) est caractérisée par une diminution du fonctionnement des reins. L'atteinte des muscles squelettiques au cours de la MRC, aussi appelée sarcopénie, est fréquente. Elle constitue un facteur de risque de perte d'autonomie et mortalité. La physiopathologie de la sarcopénie urémique est mal connue et à l'heure actuelle il n'y a pas de stratégie fiable pour lutter contre cette sarcopénie, d'où la nécessité de développer de nouvelles approches thérapeutiques.

Récemment, une nouvelle propriété du facteur intestinal de croissance FGF19 (Fibroblast Growth Factor 19) a été découverte. Ce dernier est capable de stimuler la masse et la force musculaire dans différents modèles murins physiopathologiques. Ces propriétés font du FGF19 un candidat potentiel pour lutter contre la sarcopénie induite par la MRC. Si cette étude expérimentale met en évidence un effet positif du FGF19, un essai thérapeutique chez des patients atteints de MRC pourra être envisagé.

Premièrement, dans un modèle de souris urémiques, le bénéfice d'un traitement préventif par FGF19 sera évalué. La MRC sera induite par une intervention chirurgicale en deux temps qui consiste à enlever les 5/6èmes des reins. Les souris urémiques et contrôles seront ensuite traitées pendant 15 jours par une solution de FGF19 injectée en sous-cutanée.

Deuxièmement, le potentiel curatif du FGF19 chez des souris plus âgées ayant une MRC qui évolue depuis plusieurs semaines sera déterminé. Ces souris présentent un phénotype d'altération musculaire plus avancé ainsi qu'une altération de l'os.

Dans ces deux procédures, l'impact du FGF19 sera étudié sur la sarcopénie (taille des fibres musculaires) et plusieurs paramètres métaboliques, rénaux et osseux.

Les mécanismes impliqués dans la sarcopénie urémique sont multifactoriels et ne sont pas modélisables *in vitro*. De plus, le FGF19 peut potentiellement avoir un effet bénéfique sur l'ensemble des tissus de l'organisme comme l'os, le rein et la régulation du glucose qui sont affectés au cours de la MRC. Il est donc nécessaire de recourir à une étude *in vivo* pour étudier l'impact du FGF19 sur l'ensemble de ces paramètres étant donné l'impact systémique de la MRC. Toute expérimentation *in vitro* et/ou méthode substitutive est donc impossible. Le nombre d'animaux nécessaires à ces études a été calculé au plus juste afin d'offrir la puissance statistique maximum. Trois groupes de 15 souris mâles C57BL/6J seront utilisés soit 45 souris (30 souris urémiques et 15 souris contrôles) pour le traitement préventif. Trois groupes de 15 souris mâles C57BL/6J seront utilisés soit 45 souris (30 souris urémiques et 15 souris contrôles) pour le traitement curatif. Si nécessaire et justifié ces deux procédures pourront être répétées une fois. Au maximum, 180 animaux seront donc utilisés.

L'induction de la MRC sera réalisée chez la souris par une méthode chirurgicale avec l'utilisation d'analgiques péri- et post-opératoires permettant une limitation de la douleur. Un enrichissement du milieu de vie sera mis en œuvre pour l'hébergement des souris. Les animaux seront maintenus par 5 afin d'éviter le stress de l'isolement et, en accord avec la règle des 3R les souris seront surveillées tous les jours (deux fois par jour en post-chirurgie) afin d'identifier et de limiter tout risque de souffrance ou de mal-être.

14742 Le développement de nouveaux traitements de type Host Directed Therapy (HDT) visant à manipuler directement le système immunitaire de l'hôte est en plein essor. Ce type de traitement cible un ou des mécanismes immunitaires, métaboliques, cellulaires de l'hôte. Ces nouvelles thérapies sont développées de façon non-spécifique pour cibler différentes infections ou tumeurs. Mais leur utilisation peut aussi être envisagée pour stimuler un système immunitaire défaillant, soit dû à une maladie chronique soit lié à l'âge.

En effet il est désormais bien décrit que le système immunitaire montre un certain nombre de défaillance avec l'âge, aussi bien sur le plan inné qu'adaptatif qui rend les personnes âgées plus sensibles face aux infections et au développement de tumeurs. Des recherches sont menées pour essayer de contrer les phénomènes de l'immunosénescence et rétablir un fonctionnement plus efficace du système immunitaire chez la personne âgée.

Des candidats de type HDT sont actuellement développés pour des indications en oncologie et en infectiologie et seront évalués dans une nouvelle indication qui est le traitement de l'immunosénescence. Pour cela, nous allons dans un premier temps caractériser le statut immunitaire de souris à différents âges, pour valider la présence des déficits immunitaires que nous pensons pouvoir restaurer par nos candidats et mettre au point les tests adéquats permettant de suivre ces déficits. Les âges testés seront basés sur les données déjà publiées dans la littérature afin de limiter au maximum le nombre de souris utilisées. Dans un 2ème temps, nous évaluerons l'effet des candidats dans ces souris et leur capacité à restaurer les fonctions immunitaires initialement affectées. Les souris recevront les candidats par injection, puis du sang et des organes seront prélevés afin d'étudier les fonctionnalités du système immunitaire.

Bien que le modèle murin ne reproduise pas toute la complexité des mécanismes immunitaires chez l'homme, il reste néanmoins une bonne alternative et un modèle reconnu pour l'étude de l'immunosénescence. Les altérations du système immunitaire liées à l'âge sont décrites dans le modèle murin et le nombre de tests disponibles pour évaluer la réponse immunitaire permet de faire des études complètes sur l'effet des produits immunostimulant.

A l'heure actuelle, aucun modèle *in vitro* ne peut se substituer au modèle murin pour l'étude décrite ici. Les conditions d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées seront appliquées pour respecter le bien-être de l'animal et limiter au maximum la souffrance subie par l'animal. Un suivi des animaux sera effectué quelques heures après toutes les injections et tout au long de la procédure afin de déceler d'éventuels symptômes de mal-être. Un anesthésique local sera appliqué

aux animaux avant tout prélèvement sanguin. Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet sera réduit au minimum sans compromettre les objectifs de ce dernier.

Ce projet inclura un maximum de 620 souris.

14743 La leptospirose est une maladie causée par des bactéries du genre *Leptospira*. Ces bactéries sont transmises, notamment par les rongeurs qui les hébergent dans leurs reins (sans symptôme) et les excrètent via leurs urines dans l'environnement. Les leptospires infectent l'Homme en pénétrant la peau et les muqueuses et occasionnent une infection qui se manifeste diversement, allant de symptômes pseudo-grippaux à des formes sévères, le plus souvent fatales.

A ce jour, il n'existe pas de vaccin universel, capable de conférer une protection durable et croisée pour les 400 types de leptospires identifiés. En cas de maladie, le traitement par antibiotiques n'est efficace qu'au début de l'infection. Si l'infection n'est pas traitée rapidement, le risque d'une infection rénale chronique devient majeur. La meilleure stratégie pour éradiquer l'infection consiste à empêcher les leptospires d'atteindre les reins de l'hôte et/ou d'y persister.

Les objectifs de ce projet sont 1) caractériser les différents types et sous-types d'anticorps produits chez l'hôte après infection avec des leptospires et évaluer le niveau de protection conféré et sa persistance et 2) déterminer les populations cellulaires cruciales dans la mémoire immunitaire développée par l'hôte. Le bénéfice attendu de ces données est une meilleure compréhension de la réponse immunitaire de l'hôte face aux leptospires pour in fine, proposer de nouvelles stratégies vaccinales et/ou thérapeutiques.

Le profil de réponse en anticorps produits chez l'hôte sera défini en fonction de critères liés à la souche de leptospires (séovar, virulence, dose infectante) ainsi qu'en fonction du stade de la maladie (phase aiguë ou phase chronique jusqu'à 6 mois après immunisation). Ces données immunologiques n'ont fait l'objet d'aucune étude approfondie jusqu'à présent elles sont pourtant nécessaires à la compréhension de l'immunité anti-leptospires générée chez l'hôte.

Pour répondre aux objectifs, le recours à l'animal est incontournable car seul un tel modèle nous permet de suivre la cinétique de production en anticorps chez l'hôte pendant 6 mois et mimer la réponse immunitaire humaine.

Dans la 1ère partie du projet, les souris seront immunisées par des leptospires puis, pendant 6 mois, des prélèvements sanguins seront réalisés à intervalles réguliers. Les immunisations ne devraient pas entraîner d'effets néfastes pour les souris et le volume de sang prélevé ne dépassera pas le volume maximal recommandé par les guides de bonnes pratiques pour protéger le bien-être animal. Au bout de 6 mois, les souris seront inoculées par une dose élevée de leptospires pour évaluer la persistance de la protection et son efficacité à long terme. Cette étape sera susceptible d'occasionner des effets néfastes, notamment aux animaux témoins non protégés mais notre laboratoire a une expertise fiable des conséquences chez la souris; les animaux sont suivis régulièrement, une échelle de sévérité graduée des signes cliniques observés, spécifiques, permet de définir un score et donc des points limites à partir desquels l'animal est mis à mort pour éviter toute souffrance inutile.

Dans la 2ème partie du projet, les souris immunisées avec des souches de leptospires d'intérêt, seront infectées par une dose élevée de leptospires au moment où la production en anticorps aura été déterminée comme maximale. Ces souris seront mises à mort 24h après l'infection, avant toute manifestation de la maladie. Le sang et les organes cibles de l'infection seront prélevés pour récolter et caractériser les cellules immunitaires déterminantes dans la protection contre les leptospires.

Ce projet nécessite un total de 1040 souris C57BL/6 (indifféremment femelles ou mâles, âgés de 6 à 8 semaines au moment de l'infection) sur une durée de 5 ans et comporte 2 procédures, classées de sévérité modérée. Il est défini dans le respect du principe des 3R. Remplacement Le maximum des études hôte -pathogène sont réalisées grâce à des expériences *in vitro*. Réduction Le minimum de souches de leptospires et de conditions d'immunisation sera testé, de même le minimum d'animaux nécessaire à l'obtention de données statistiquement robustes sera utilisé. Ce nombre a été défini d'après notre expérience, et avec l'aide d'un biostatisticien. Des tests statistiques de type Mann-Whitney et ANOVA, seront appliqués pour déterminer la significativité des données.

Raffinement Les animaux sont hébergés et manipulés selon des bonnes pratiques établies, et leur état général est surveillé régulièrement selon une procédure également prédéfinie. Toute altération du comportemental ou de l'état général des animaux entraînera un renforcement de la surveillance, de façon à intervenir au plus tôt et éviter toute souffrance inutile.

14744 Les changements climatiques globaux impliquent des variations de température et d'accessibilité à l'eau au sein des habitats naturels. Chez les animaux à température variable (ectothermes), les besoins thermiques varient au cours de la saison et du cycle de reproduction, et peuvent interagir avec les besoins hydriques. Chez les espèces vivipares, les besoins hydriques et thermiques dépendent du stade de gestation. Si la ressource en eau devient limitante des conflits physiologiques vont émerger entre besoins hydriques et thermiques. La vipère péliade (*Vipera berus*) est une espèce Euro-Sibérienne vivant dans les milieux frais et humides mais désormais exposés à des sécheresses. L'objectif de ce projet est de quantifier les réponses écophysiologiques de vipères gestantes exposées à des périodes de privation d'eau à différents stades de la gestation. Un suivi de paramètres physiologiques (hormones), et morphologiques (masse, taille) sera effectué sur les femelles gestantes, et les nouveau-nés seront suivis (morphologie) en captivité pendant un mois. Cette étude permettra d'identifier les effets des contraintes hydriques sur les femelles gestantes et leurs embryons.

Les femelles en début de gestation seront capturées dans des population naturelles et séjourneront de façon transitoire en captivité. Elles seront exposées à deux conditions d'accès à l'eau de boisson (ad-libitum / privation) à deux stades de gestation (début/ fin) ce qui fait quatre conditions expérimentales. La durée de privation sera de 3 semaines ce qui est classiquement observé en conditions naturelles. Le nombre d'individus par traitement est de 12 soit un total de 48 femelles gestantes. Le nombre de jeunes attendu est de 240 soit un totale de 288 individus (48 femelles et 240 jeunes). Les nouveaux-nés seront maintenus en conditions standards et des mesures morphométriques seront effectuées afin de mesurer l'effet du traitement maternel sur leur croissance. Les femelles seront relâchées sur le site de capture après les mises bas. Les jeunes seront relâchés après la phase de croissance. La vipère péliade est un modèle particulièrement pertinent pour tester nos hypothèses compte tenu de sa dépendance aux conditions hydriques.

La règle des trois R a été prise en compte de la manière suivante

-Remplacement L'étude concerne spécifiquement les réponses physiologiques de femelles gestantes de cette espèce. Il n'est pas possible de remplacer les vipères vivantes par d'autres processus. Les individus sauvages sont replacés dans leur environnement d'origine après l'expérience.

-Réduction Le nombre de femelles sera réduit au minimum (12 par groupe) pour permettre de détecter des différences physiologiques et hormonales significatives

-Raffinement Les périodes de restrictions hydriques sont réduites à des périodes courtes et telles qu'elles peuvent survenir en conditions naturelles. La durée de manipulation est réduite au minimum et la quantité sang prélevée sera limitée à 150 microlitres par prise. Les conditions d'hébergement en captivité sont optimisées.

14745 La maladie de parkinson est une maladie neurodégénérative qui affecte en premier lieu les neurones à dopamine d'une région précise appelée la substance noire compacte (SNc) générant de profondes altérations motrices chez l'Homme.

En plus de ces symptômes moteurs, des symptômes non moteurs affectent considérablement la qualité de vie des patients parkinsoniens y compris les sensations douloureuses qui sont très présentes chez la majorité des patients. Le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques est très crucial pour l'amélioration du quotidien des patients et la prise en charge de leur douleur. Ce projet vise à étudier 1) les conséquences de la perte des neurones à dopamine sur le fonctionnement des neurones impliqués dans la douleur au niveau de la moelle épinière et 2) le contrôle de leur activité électrique par les neurones à sérotonine en utilisant des approches innovantes comme l'optogénétique. Nous analyserons plus particulièrement les réponses

comportementales sensorielles chez la souris ainsi que l'activité électrique des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière et la modification de leur activité par les neurones à sérotonine. Cette étude sera conduite sur le modèle de souris de la maladie de Parkinson obtenue après injection d'une neurotoxine dont l'effet est de détruire spécifiquement les neurones à dopamine de la zone cible (SNc).

Ce projet respecte la règle des 3R. Ainsi, pour le R de Raffiner, tous les protocoles sont réalisés par des experts dans le domaine et sont ainsi optimisés pour soulager le stress et la douleur des animaux. Les animaux seront surveillés quotidiennement par l'expérimentateur avec une surveillance renforcée après la chirurgie jusqu'à la fin de l'expérimentation avec la mise en place d'une réhydratation, un réchauffement, des traitements vétérinaires si besoin. Des points limites sont définis pour éviter la souffrance des animaux. Pour le R de Remplacer, le recours au modèle animal est indispensable car ce projet demande une évaluation comportementale et aucun modèle *in vitro* ne peut reproduire les conditions de la pathologie étudiée. La réduction du nombre d'animaux (R de réduire) est prise en compte tout en conservant une signification scientifique statistique qui tient compte de l'hétérogénéité inter-individuelle. Le nombre de souris utilisé dans chacun des groupes expérimentaux ne dépassera pas ainsi 20 animaux par groupe. La réalisation de ce projet dans son ensemble nécessite au total l'utilisation de 240 souris de type C57Bl/6J.

14746 Les troubles du spectre autistique appartiennent à la famille des troubles neurodéveloppementaux, dont la prévalence est en augmentation constante. A l'heure actuelle, il n'est le plus souvent pas possible d'établir un diagnostic étiologique concernant les bases moléculaires et physiopathologiques de ces troubles, pour lesquels il n'existe par ailleurs pas de thérapeutique spécifique.

L'objectif de ce projet consiste à rechercher, chez un modèle animal de trouble autistique, des marques épigénétiques spécifiques dans les neurones et les cellules sanguines. Ces marques correspondent à des modifications au niveau de l'ADN, mais sans modification du code génétique. Elles sont influencées par l'environnement, dont l'exposition *in utero* à certains médicaments, et ont un rôle particulièrement important au cours du développement.

Ce projet pourrait permettre d'améliorer les connaissances sur les bases moléculaires de cette pathologie du neurodéveloppement, qui sont à ce jour encore très mal connues. Cette étude pourrait également permettre de développer des tests biologiques permettant un diagnostic précoce de ces troubles et pourrait suggérer de nouvelles cibles thérapeutiques.

Les modèles animaux de souris dans ces pathologies se sont révélés d'une grande utilité et plus spécifiquement la souche C57/Bl6, très utilisée comme modèle animal de troubles neurologiques et psychiatriques.

Une attention particulière est portée afin d'être en conformité aux 3R.

Remplacer : Ces approches nécessitent du tissu cérébral et du sang périphérique prélevés le même jour et non traités ni congelés, ce qui est uniquement accessible dans des modèles d'animaux vivants. Il n'est donc pas envisageable d'utiliser des méthodes de substitution à l'animal entier.

Réduire : (I) Nous avons rédigé un protocole expérimental rigoureux avant toute expérimentation. (II) Nous avons entrepris de réduire aux maximum le nombre d'animaux en planifiant des expériences qui nous semblent absolument nécessaires pour répondre à nos objectifs scientifiques. (III) Nous mettrons en place des tests statistiques performant (IV) Plusieurs tissus (sang et cerveau) seront analysés pour chaque animal (V) Une partie de l'ADN extrait de chaque prélèvement sera stocké pour effectuer d'éventuelles analyses complémentaires sans recourir à de nouveaux animaux :

Raffiner : (I) Nous avons planifié nos expériences en gardant à l'esprit la nécessité de réduire, sinon de soulager l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'angoisse subie par les animaux, et (II) dans le but d'obtenir plus d'informations pertinentes à moindre coût en terme de "mal être" animal. Le bien-être des animaux sera pris en compte à chaque étape.

Ainsi, et d'après nos estimations, nous aurons besoins de 94 souris

14747 La schizophrénie est une maladie apparaissant chez l'adolescent ou le jeune adulte et qui se traduit par des symptômes tels que des hallucinations, l'isolement social, un seuil sensorimoteur affecté ainsi que des déficits cognitifs. Les observations cliniques indiquent que l'administration aiguë ou chronique de cannabis induit des déficits comportementaux et cognitifs similaires à ceux observés dans la schizophrénie. De manière analogue, les cannabinoïdes synthétiques ont été associés à des psychoses et des altérations de type psychotique.

Une période développementale vulnérable pour les conséquences du cannabis est l'adolescence. En effet, l'utilisation de cannabis à l'adolescence augmente le risque de l'incidence des psychoses à la fois chez le patient sain et le patient psychotique. Cependant, les altérations moléculaires induites par les cannabinoïdes lors de cette période sensible, ainsi que leurs conséquences, restent inconnues. De plus, la signalisation des endocannabinoïdes régule d'importantes étapes du développement neuronal, expliquant pourquoi l'intoxication prénatale au cannabis a des conséquences majeures. L'expérimentation animale représente donc une approche essentielle pour la compréhension des effets de l'utilisation de la marijuana chez l'adulte, l'adolescent ou lors de l'intoxication prénatale

D'un point de vue méthodologique, ce projet respecte la règle des 3R. Ainsi, pour le R de remplacer, le recours au modèle animal (souris dans ce cas) est indispensable car cette étude nécessite une évaluation comportementale et aucun modèle *in vitro* ne peut reproduire les conditions de la pathologie étudiée. Pour le R de réduire, nous limitons les groupes expérimentaux à un minimum acceptable statistiquement d'où le choix de (12/15) animaux par groupe. Ce nombre prend en compte l'erreur due à l'utilisation de différentes lignées de souris et aussi des variabilités inter-individuelles. Pour le R de raffiner, tous les protocoles sont optimisés pour soulager le stress et la douleur des animaux tout au long de cette étude. Ainsi, la chirurgie stéréotaxique est réalisée sous anesthésie générale avec une couverture antalgique (lidocaïne en local et buprenorphine en sous-cutanée) qui permettra une limitation de la douleur pendant et après le réveil de l'animal. Les animaux seront surveillés quotidiennement par les zootechniciens et les expérimentateurs avec une surveillance renforcée après la chirurgie et la mise en place d'une réhydratation, un réchauffement et des traitements vétérinaires si besoin. Des points limites sont définis et décrits dans les procédures pour éviter la souffrance des animaux.

La réalisation de ce projet dans son ensemble nécessite au total l'utilisation de 2000 souris sur une période de 5 ans. Ce nombre peut sembler élevé au premier abord mais il se justifie par l'utilisation de différentes approches comportementales, pharmacologiques et génétiques qui se dérouleront sur 5 ans.

14748 Les inflammations pulmonaires sont responsables de 2,5 millions de morts par an dans le monde. Une détection précoce permettrait de protéger les poumons avant que leur dégradation soit irréversible. Dans ce projet il s'agit de détecter une inflammation pulmonaire à son début avant tout changement anatomique et physiologique visible par les méthodes actuelles. Notre méthode doit permettre de fournir une image de la biochimie des poumons par une simple IRM. Pour ce faire un agent de contraste sensible à l'activité de l'élastase doit être instillé dans les poumons des souris à étudier par voie intra-nasale et/ou intra-trachéale et/ou intraveineuse.

Remplacement : L'utilisation d'animaux pour la mise au point de cette méthode est requise car il n'existe pas de moyens de simuler l'anatomie et la physiologie complexes d'un poumon sain ou inflammatoire en raison d'un nombre de paramètres physiques, physico-chimiques, biochimiques et pharmacologiques trop important pour être modélisé.

Dans notre dispositif expérimental seules des souris ont la taille requise pour nos tests. De plus les modèles de d'inflammation pulmonaires sont très bien connus pour cet animal.

Les souris seront soit saines soit auront subi au préalable une instillation pulmonaire de LPS afin de provoquer une inflammation aiguë. Le type d'IRM utilisé est l'IRM rehaussé par l'effet Overhauser une technique capable de révéler nos agents de contrastes spécifiques.

Réduction : Le nombre d'animaux sera réduit du fait de l'IRM qui une fois validée devient une méthode d'étude longitudinale et peu invasive c'est-à-dire qu'on pourra suivre l'état des poumons

d'une même souris au cours du temps sans devoir la sacrifier. Ainsi nous pourrions faire le suivi longitudinal d'une inflammation pulmonaire par cette méthode non invasive.

Un maximum de 500 souris pourra être utilisé.

Raffinement : Les animaux sont hébergés en cage collective, dans un milieu enrichi avec des maisonnettes, de la paille, du coton et des bois à ronger. Différents enrichissements sont proposés en alternance pour introduire de la nouveauté. L'état de santé des animaux sera suivi quotidiennement.

Si certains animaux manifestent une douleur, de la souffrance ou un certain inconfort, ces dits animaux seront pris en charge par l'administration de médicaments adaptés, de soins et de technique de nursing. Les examens par IRM et les instillations seront faits sous anesthésie générale.

14749 Les pathologies respiratoires des jeunes enfants sont un problème majeur de santé publique car elles constituent la première cause de mortalité. Le virus respiratoire syncytial (RSV) humain est l'agent principal des bronchiolites du nourrisson, dont la sévérité engendre un risque accru de développer de l'asthme en grandissant. Obtenir un traitement efficace contre ces infections est une priorité de l'OMS.

L'infection RSV a pour particularité de causer des atteintes sévères des voies respiratoires inférieures chez le nouveau-né. Cette sensibilité du jeune à une infection RSV est intrinsèquement liée aux caractéristiques immunologiques de la muqueuse pulmonaire en période néonatale qui dépendent de la mise en place de l'immunité et de la colonisation du poumon par un microbiote bactérien.

Le microbiote représente l'ensemble des micro-organismes qui interagissent avec un organe d'un être vivant. Les organes possédant un microbiote sont ceux qui présentent une interface entre le milieu intérieur et extérieur de l'individu (peau, intestin, etc...). Le microbiote est un élément essentiel à certains processus biologiques, comme la digestion ou encore la modulation de la réponse immunitaire (immunomodulation) perpétrées au niveau intestinal.

Bien qu'il ait longtemps été considéré comme un organe exempt de micro-organismes, le poumon possède un microbiote situé à la surface de ses muqueuses. De plus, il a été démontré que les patients souffrants de pathologies respiratoires, comme l'asthme allergique, présentent des modifications anormales de populations bactériennes du microbiote pulmonaire. Ces modifications, nommées communément dysbioses, suggèrent que le microbiote pulmonaire peut jouer un rôle dans le développement et/ou l'exacerbation de ces pathologies.

Notre hypothèse est que le microbiote, de manière générale, est également capable d'induire un phénomène d'immunomodulation au niveau des voies respiratoires et notamment dans les poumons. Dans ce contexte, nous pensons que l'infection RSV peut être impactée par ce processus d'immunomodulation.

Afin de valider notre hypothèse, nous proposons dans ce projet d'infecter avec le RSV-luciférase (virus pouvant être détecté par bioluminescence) humain, en période néonatale et à l'âge adulte, des souris C57Bl/6 possédant un microbiote exempt de pathogènes (EOPS) et axéniques (souris dépourvues de microbiote de manière générale). Cette action nous permettra d'évaluer l'effet de la présence du microbiote sur la réplication virale et la réponse immunitaire des voies respiratoires. Cela nous permettra également de comparer les réponses obtenues entre la souris adulte et le nouveau-né et donc peut-être de comprendre pourquoi la réponse immunitaire est différente entre ces deux périodes de la vie.

Le recours aux animaux est indispensable pour répondre aux questions scientifiques du projet qui s'échelonne sur une période de 5 ans et nécessitera au maximum 432 souris (nouveau-nés et adultes). Ce nombre est justifié par le fait que la pertinence d'une expérience repose sur la réalisation de tests statistiques pour attester d'une différence biologique ainsi que l'inclusion de groupes expérimentaux témoins.

Les souriceaux élevés avec leur mère (2 portées/cage) ainsi que les souris adultes auront à disposition du matériel pour nidifier (papier mouchoir) depuis leur naissance jusqu'au sevrage et

seront observés tous les jours par le personnel de l'animalerie jusqu'à leur autopsie. Les animaux seront anesthésiés avec une solution de kétamine/Xylazine en intrapéritonéale puis infectés par voie intranasale (10µL/ sourisceaux et 50µL/souris adultes). Afin d'étudier l'influence du microbiote sur l'infection RSV, nous devons réaliser les infections intranasales dans 2 animaleries différentes. Lors de l'expérimentation, il y aura 2 groupes de souris par animalerie ceux traités avec la solution contrôle et ceux infectés par le RSV. Ce nombre de groupes sera multiplié par 2 car nous aurons 2 temps de cinétiques par expérimentation (J1 et J4 post-infection pour les souris adultes et J1 et J2 post-infection pour les sourisceaux). Les animaux seront donc euthanasiés par une surdose d'anesthésiques administrée par voie parentérale à des temps précis. A l'autopsie, des lavages broncho-alvéolaires seront réalisés et les poumons ainsi que les fosses nasales seront prélevés afin d'analyser différents paramètres immunologiques.

14750 Clostridioides difficile (*C. difficile*) est une bactérie considérée comme étant la première cause de diarrhée nosocomiale chez l'adulte dans les pays développés (> 24000 cas par an en France). Dans 14 % des cas, il existe des formes compliquées dont la plus connue est la colite pseudomembraneuse, marquée par 3 % de mortalité. La réponse inflammatoire qui résulte de l'infection à *C. difficile* peut en effet être néfaste pour l'organisme si elle est trop importante et contribuer à la formation de la colite pseudomembraneuse. Les infections à *C. difficile* peuvent évoluer sur un mode épidémique (exemple de l'épidémie qui a touché tout le Nord de la France en 2006), et représente un coût sanitaire important, en raison de l'augmentation des durées moyennes de séjours et du surcoût des soins associés. Malgré des traitements antibiotiques généralement efficaces, les récurrences des infections à *C. difficile* sont fréquentes (environ 20 %) et des résistances aux antibiotiques apparaissent. Afin de diminuer la réponse inflammatoire, nous nous sommes intéressés aux microARNs (miRNAs) qui sont de plus en plus décrits comme régulateur de la réponse immunitaire lors des infections. Dans un précédent projet nous avons mis en évidence l'efficacité d'un miRNA comme outil thérapeutique permettant de diminuer cette réponse inflammatoire dans un modèle de souris infectées par *C. difficile* (brevet en cours).

Nous envisageons d'optimiser l'utilisation de ce miRNA 1) en comparant à différents temps d'administration la capacité du miRNA à réduire la réponse inflammatoire au niveau du caecum de souris infectées par la bactérie, lieu principale de l'infection, 2) en évaluant une éventuelle toxicité du miRNA en mesurant certains marqueurs de toxicité au niveau du foie, 3) en évaluant son intérêt dans un autre modèle d'inflammation intestinale qui mime les symptômes de la maladie de Crohn. Ceci sera un préalable indispensable à la poursuite des prochaines étapes de développement clinique de cette molécule.

L'exigence de réduction, raffinement, et remplacement des animaux sera respectée

Remplacement plusieurs tests *in vitro* sur un modèle de cellules de l'intestin ont permis de démontrer au préalable que le miRNA présentait une activité anti-inflammatoire intéressante. L'étape de vérification de son activité *in vivo* est exigible réglementairement avant toute nouvelle phase de développement clinique. Le recours à l'animal est indispensable pour étudier tous les aspects d'un processus infectieux et valider de nouvelles cibles thérapeutiques car il n'existe à ce jour aucun modèle *in vitro* ou *in silico* capable de reproduire la complexité du processus infectieux dans son intégralité.

Réduction une planification statistique minutieuse a permis de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en préservant la validité statistique de l'étude afin d'avoir une puissance statistique suffisante pour observer un effet. Les groupes contrôles des animaux ont été mutualisés aussi souvent que possible. Au total, un nombre maximal de 81 souris sera nécessaire pour les différentes procédures de cette étude.

Raffinement les animaux seront surveillés quotidiennement et leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer que les animaux subissent le minimum de stress possible. En particulier, les litières seront changées quotidiennement et les animaux auront un accès direct et illimité à l'eau de boisson et à la nourriture. La procédure sera pratiquée si nécessaire en utilisant des anesthésiques permettant de limiter la souffrance des animaux qui

bénéficieront d'une procédure d'euthanasie anticipée et une sortie d'étude prématurée en cas d'atteinte des points limites éthiquement non acceptables.

Les résultats de cette étude permettront d'envisager de nouvelles méthodes de contrôle de l'infection à *C. difficile* et d'élargir à d'autres maladies inflammatoires l'utilisation d'un miRNA comme molécule thérapeutique.

14751 Du fait de l'incapacité du système nerveux central (SNC) à s'auto-réparer, les traumatismes du SNC sont dévastateurs. La transplantation neuronale a été explorée comme une approche potentielle permettant de rétablir les fonctions cérébrales en remplaçant les neurones perdus par de nouveaux neurones. Nous avons préalablement démontré que des neurones transplantés issus de cellules fœtales murines pouvaient efficacement rétablir des connexions spécifiques après une lésion corticale indiquant que la réparation cellulaire du cortex et des projections corticales était possible chez la souris.

Dans ce projet, nous proposons, dans un modèle animal de traumatisme crânien de greffer des neurones moteurs corticaux issus de cellules souches pluripotentes humaines et ainsi

1) d'étudier l'intégration fonctionnelle des cellules greffées au sein du cerveau hôte dans le cortex de souris

2) d'évaluer si la culture des neurones moteurs corticaux à l'aide de biomatériaux améliore la survie et l'intégration des neurones du transplant.

Les lésions seront effectuées au niveau du cortex moteur, avec un appareil de lésion cérébrale traumatique TBI (modèle animal mimant les traumatismes crâniens chez l'Homme).

Enfin, nous grefferons des cellules souches humaines maintenues en culture et différenciées en précurseurs neuronaux. L'intérêt thérapeutique de ces cellules est leur capacité à se multiplier à l'infini *in vitro* et d'éliminer tous les risques de rejets chez les patients. De plus, dans ces cellules, une opsine (Channelrhodopsine ou Archeorhodopsine) sera exprimée. Cette technique permet, une fois les cellules greffées de les activer ou de les inhiber par de la lumière lors d'une tâche comportementale ou lors de la mesure de l'activité des neurones (électrophysiologie).

Enfin, afin d'améliorer la survie des neurones greffés ainsi qu'une meilleure intégration au sein du réseau cérébral, une partie des cellules greffées sera cultivée avec du biomatériau (acide hyaluronique), avant d'être greffée.

Un protocole complet nécessite l'utilisation de 400 animaux. La règle des 3R a été prise en considération. De nos jours, il n'est pas encore possible de modéliser un cerveau de mammifère *in vitro*, qui nous permettrait d'étudier la transplantation et donc de remplacer cette étude par des expériences *in vitro*. Nous avons réduit au maximum le nombre d'animaux nécessaires en expérimentation tout en s'assurant d'en avoir le nombre suffisant pour avoir une étude interprétable sur le plan statistique. Enfin, la notion de raffinement a été appréhendée à travers les conditions d'expérimentation qui sont optimisées (sédation et analgésie pour toute manipulation douloureuse ou stressante) afin de s'assurer du bien-être des animaux tout au long des procédures expérimentales.

14752 L'évolution des modes de vie tend de plus en plus à combiner la sédentarité avec les mauvaises habitudes alimentaires, propices à la survenue de l'obésité. Ainsi, en 2016, un total de 650 millions de cas était recensé dans le monde. Cette situation pathologique est, un problème majeur de santé publique. L'obésité est la plupart du temps associée à des hyperlipidémies, une glycémie à jeun augmentée et de l'hypertension. La concordance de ces différents facteurs de risque forme le syndrome métabolique qui accroît les probabilités d'AVC, de pathologies cardiaques ou encore de diabète de type 2.

L'obésité résulte d'un excès de graisse blanche, essentiellement un organe de stockage d'énergie. En revanche, le tissu adipeux brun est comme un générateur de chaleur, plutôt que de stocker de l'énergie apportée en excès dans l'organisme, il en brûle. Ainsi, environ 50 g de graisse blanche stockent 300 kilocalories d'énergie. La même masse de graisse brune brûle la même quantité, soit 300 kilocalories par jour. Le tissu adipeux brun est donc un organe capable de brûler rapidement

les graisses et peut s'opposer à leur stockage. Potentiellement, ce tissu a donc un rôle anti-obésité. Cependant, transplanter des cellules souches de tissu adipeux brun pour traiter le syndrome métabolique reste limité par les risques que représenteraient ces cellules libres dans l'organisme (risque de tumeur). De plus, il serait nécessaire de mettre en place un traitement antirejet nécessaire à la survie de la greffe.

Afin de contourner ces limites, une des stratégies consiste à encapsuler ces cellules dans un dispositif implantable, afin de les protéger du système immunitaire, tout en laissant passer les nutriments, l'oxygène et l'ensemble des molécules nécessaires à la survie et à la fonction des cellules. Un tel dispositif médical a déjà été validé pour le diabète de type 1 où il permet de réguler la glycémie d'animaux diabétiques une fois rempli avec des cellules sécrétrices d'insuline. L'objectif est donc désormais de tester notre dispositif médical pour une autre application l'obésité et le syndrome métabolique.

Pour mener à bien cette étude, il sera tout d'abord nécessaire de mettre au point le modèle de syndrome métabolique. Il s'agira d'un modèle induit par l'alimentation. Ainsi, des rats seront rendus obèses par administration d'un régime riche en graisse et en sucre (Fructose dans l'eau de boisson) en privilégiant trois temps d'étude Un court terme qui rend rapidement les animaux obèses et initie le syndrome métabolique (2 mois de régime), un temps intermédiaire (4 mois) et un long terme (6 mois) qui nous permettra de déterminer le temps d'induction optimal pour le modèle.

Dans un second temps, des dispositifs d'encapsulation de cellules seront implantés chez des rats avant l'induction du syndrome métabolique à l'aide du protocole mis au point dans la première phase de l'étude. L'induction sera également réalisée chez des rats contrôles implanté avec un disque de membrane de taille identique au dispositif. De plus, des rats ayant une alimentation normale, sans dispositif ni cellules transplantées seront utilisés comme contrôles sains. Une fois les dispositifs implantés, l'induction du syndrome métabolique réalisée, les cellules seront injectées. Il s'agit de cellules souches Humaines différenciées en cellules adipocytaires brunes. Après injection des cellules, un suivi métabolique hebdomadaire est réalisé pendant 4 mois (poids, C-peptide, glycémie, cholestérol, prise alimentaire et de boissons) chez l'ensemble des animaux (obèses avec dispositif et cellules, contrôles obèses et sains). Une hyperglycémie provoquée par voie orale sera en parallèle réalisée tous les mois ce qui permettra d'évaluer la tolérance au glucose. Les animaux seront ensuite mis à mort pour étudier en détail l'impact de ces cellules sur les tissus cibles (graisse blanche, foie, muscle et pancréas). Ici, le recours à une méthode alternative n'est pas possible car le syndrome métabolique implique trop de tissus et d'interactions pour être modélisé *in vitro*, même partiellement.

Remplacement Le but de cette étude est d'évaluer l'effet d'une thérapie cellulaire basée pour le traitement du syndrome métabolique. Les mécanismes impliqués sont complexes et mettent en jeu différents tissus et organes, ce qui rend la modélisation *in vitro* impossible. De plus, il s'agit de tester un dispositif implantable, ce qui nécessite d'un point de vue réglementaire d'avoir recours à des modèles animaux au cours de la validation pré-clinique du produit.

Réduction Le nombre d'animaux utilisés sera de 12 pour chaque groupe expérimental. Cela permettra, en prenant en compte la réussite du modèle d'induction d'obésité, d'avoir assez d'individu pour réaliser des analyses statistiques suffisamment puissantes sur les résultats des différents paramètres étudiés.

Raffinement Il intervient au niveau de l'anesthésie, avec l'utilisation d'une anesthésie gazeuse pour un meilleur contrôle, et de la prise en charge post-opératoire par l'administration d'un anti-inflammatoire et anti-douleur. Il intervient également un niveau de l'hébergement avec des conditions de température et d'hygrométrie contrôlées, un enrichissement des cages et un accès à volonté à l'eau et à la nourriture. Etant donné la prise de poids attendue pour cette étude, les rats seront hébergés à trois par cage dès le de l'étude afin d'éviter de changer la répartition des animaux en cours d'étude, ce qui peut être source de stress. Le raffinement est aussi présent dans le suivi des animaux, avec l'utilisation d'une grille d'évaluation adaptée aux procédures, qui permet de détecter rapidement la souffrance, la douleur chez les animaux et de mettre en place les traitements adaptés.

Au total, cette étude nécessitera 72 rats pour la mise au point du modèle de syndrome métabolique et 36 rats pour le test du dispositif rempli avec des cellules de tissu adipeux brun. Cela représente un total de 108 rats.

14753 Le but de cette étude est d'essayer de définir le rôle potentiel des lasers non thermiques rouge (660 nm) et infrarouge (850 nm) dans la remyélinisation des nerfs périphériques. De nombreux travaux publiés dans la littérature ont déjà montré l'effet positif de cette nouvelle technologie (photobiomodulation) sur la repousse axonale et l'effet anti-inflammatoire. Cependant, l'effet sur la remyélinisation reste à préciser par une étude fondamentale.

Nous espérons montrer l'effet positif des lasers non thermiques sur la récupération de la paralysie faciale induite par une lésion du nerf facial chez la souris.

Un écrasement de deux branches (branche zygomatique et branche buccale) du nerf facial est effectué sous anesthésie générale pendant 10 secondes. Des antalgiques sont donnés en post-opératoire durant les deux premiers jours. Au réveil, les souris ont une paralysie faciale (paralysie des vibrisses et absence de fermeture de la paupière) unilatérale totale, qui récupère rapidement en 8 jours. En particulier, la mobilité des vibrisses redevient normale tout comme la fermeture de l'oeil en 14 jours. Nous appliquons localement et sur l'abdomen un traitement par photobiomodulation (laser non thermique rouge et infrarouge) pendant 14 jours. La mobilité des vibrisses des souris est appréciée quotidiennement en filmant avec une caméra haute définition les vibrisses des souris tête libre.

Nous comptons utiliser un total de 288 souris en quatre ans car nous étudions l'effet induit à la fois sur la récupération des mouvements des vibrisses, sur la reconnexion des motoneurones faciaux et la remyélinisation du nerf facial. Trois groupes de souris seront étudiés : 1. Des souris traitées par photobiomodulation faciale seule; 2. Des souris traitées par photobiomodulation abdominale; 3. Des souris traitées par photobiomodulation faciale et abdominale.

Les procédures seront optimisées afin de respecter les devoirs de Réduction et Raffinement. Nous utiliserons des tests statistiques appropriés afin d'obtenir des résultats exploitables à partir du plus petit nombre d'animaux possible. L'étude *in vitro* n'est pas possible car nous travaillons sur la plasticité post-lésionnelle en étudiant à la fois la récupération comportementale et neuronale. L'optimisation des soins aux animaux nous permettra de diminuer la durée de l'étude. La surveillance journalière des souris nous permet d'arrêter à tout instant la procédure expérimentale si l'animal présente des signes d'anxiété, de stress ou de douleur mineure.

En clinique, les lésions des nerfs périphériques sont fréquentes et la récupération fonctionnelle est souvent insuffisante. Notre but à terme est de proposer de nouvelles méthodes de traitement chez l'Homme basées sur la Photobiomodulation et d'étendre ce traitement potentiel et non invasif à d'autres types de pathologies nerveuses (sclérose en plaque, démyélinisation post traumatique, maladies inflammatoires chroniques).

14754 Les phéochromocytomes et paragangliomes malins (PPM) sont des cancers rares dont le pronostic vital est péjoratif avec un taux de survie à 5 ans inférieur à 50%. Leur apparition se fait soit spontanément soit dans le cadre d'une maladie héréditaire. En particulier des mutations familiales impliquant une invalidation du gène SDH-B ont été associées à des formes plus graves de la maladie.

L'incidence très faible des PPM (1 pour 1 million) est un facteur limitant à l'évaluation clinique de nouveaux traitements. Récemment, dans notre équipe, 4 modèles cellulaires de phéochromocytome humain SDH-B invalidé (clones) ont été développés à partir de la seule lignée cellulaire humaine de PPM disponible (hPHEO1). Ces 5 modèles cellulaires sont pertinents pour l'étude de nouvelles stratégies thérapeutiques chez les patients présentant un PPM SDH-B sauvage (lignée hPHEO1) ou SDH-B invalidé (clones). A partir de l'ensemble de ces lignées cellulaires nous avons pu sélectionner, *in vitro*, 4 traitements (sur 5) et 2 combinaisons de traitements (sur 10) prometteurs pour la prise en charge des patients.

L'évaluation de différents traitements sur nos modèles cellulaires nous a donc permis d'identifier des traitements prometteurs pour la prise en charge thérapeutique des patients atteints d'un PPM SDHB sauvage ou muté. Cependant, l'évaluation de ces traitements sur des modèles *vivo* reste indispensable avant la mise en place d'études cliniques, notamment pour confirmer l'efficacité de ces traitements sur un organisme entier dont la physiologie se rapproche de celle de l'homme et pour identifier la dose thérapeutique efficace la mieux tolérée.

Ce projet a pour but d'évaluer l'efficacité et les toxicités potentielles de ces traitements sur des modèles murins, dont la physiologie se rapproche de celle de l'Homme. Lors de notre étude, 660 animaux seront utilisés sur 2 ans afin d'évaluer les 4 traitements et les 2 combinaisons de traitements (présélectionnés *in vitro*) sur des modèles de souris immunodéprimées et xénogreffées avec la lignée parentale (SDH-B sauvage) ou des clones présentant une invalidation du gène SDH-B. Seuls 2 clones SDH-B invalidés, présélectionnés *in vitro* parmi les 4 établis, seront étudiés *in vivo*. Une planification statistique a permis de réduire le nombre d'animaux utilisés tout en déterminant la validité statistique de l'étude. Les contraintes pour les animaux seront celles de l'injection de lignées cellulaires tumorales par voie sous-cutanée (sous anesthésie générale). La taille de ces tumeurs sera très régulièrement mesurée et surveillée pour limiter les contraintes pour les animaux. Les traitements par des médicaments anticancéreux à tester seront donnés par voie orale ou par simple injection sous anesthésie locale.

L'établissement de l'efficacité des différents traitements seuls ou en combinaison a le potentiel de déboucher sur des traitements efficaces chez l'Homme pour des maladies dont le pronostic reste très sombre actuellement.

14755 Incontinentia pigmenti (IP) est une maladie génétique rare. Elle est létale très tôt au cours du développement embryonnaire chez les garçons. Elle se caractérise chez les filles par une inflammation cutanée sévère qui survient à la naissance et, pour une fraction d'entre elles, des anomalies oculaires, dentaires et cérébrales. Les causes des problèmes cérébraux, qui peuvent conduire à une paralysie et à un déficit intellectuel, restent très mal comprises, bien que le gène impliqué dans la maladie ait été identifié. Il code la protéine NEMO, qui joue un rôle essentiel dans une voie de signalisation agissant dans une multitude de situations physiologiques (immunité, croissance cellulaire, protection contre la mort cellulaire etc...).

Le but de ce projet est de mieux comprendre l'origine des anomalies cérébrales en détectant les éventuelles anomalies structurales et/ou vasculaires dans le cerveau des souris femelles mutées sur le gène Nemo, qui représentent un modèle de la maladie IP. Ce modèle rongeur transgénique mime pathologiquement et génétiquement la situation humaine, à la fois concernant la dermatose et la transmission du défaut génétique. L'analyse cérébrale sera réalisée en utilisant la technique d'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) et la technique iDISCO qui analyse intégralement les cellules et les protéines d'un cerveau par détection immuno-microscopique. A ce jour, aucun modèle cellulaire ou informatique ne peut fournir des informations permettant de comprendre les mécanismes de la pathologie de l'IP. Le recours à des investigations *in vivo* est donc nécessaire.

C'est pourquoi, 120 animaux seront étudiés dans ce projet, tous nés et élevés dans des élevages agréés à des fins scientifiques. Ce nombre a été défini comme un minimum nécessaire pour l'analyse statistique des données.

Les animaux sont observés quotidiennement par une équipe de zootechniciens en charge de leurs soins et de manière plus accrue lorsque la pathologie cutanée commence à se développer. Des critères d'arrêt très précis ont été déterminés pour intervenir en cas de signe de souffrance.

Leur hébergement en groupe sociaux dans des cages enrichies d'objets en accord avec la réglementation sont mis en place pour améliorer leur bien-être.

14756 Les pathologies respiratoires des jeunes enfants sont un problème majeur de santé publique car elles constituent la première cause de mortalité. Le virus respiratoire syncytial (RSV) humain est l'agent principal des bronchiolites du nourrisson, dont la sévérité engendre un risque accru de

développer de l'asthme en grandissant. Obtenir un traitement efficace contre ces infections est une priorité de l'OMS.

L'infection RSV a pour particularité de causer des atteintes sévères des voies respiratoires inférieures chez le nouveau-né. Cette sensibilité du jeune à une infection RSV est intrinsèquement liée aux caractéristiques immunologiques de la muqueuse pulmonaire en période néonatale qui dépendent de la mise en place de l'immunité et de la colonisation du poumon par un microbiote bactérien.

Le microbiote représente l'ensemble des micro-organismes qui interagissent avec un organe d'un être vivant. Les organes possédant un microbiote sont ceux qui présentent une interface entre le milieu intérieur et extérieur de l'individu (peau, intestin, etc...). Le microbiote est un élément essentiel à certains processus biologiques, comme la digestion ou encore la modulation de la réponse immunitaire (immunomodulation) perpétrées au niveau intestinal.

Bien qu'il ait longtemps été considéré comme un organe exempt de micro-organismes, le poumon possède un microbiote situé à la surface de ses muqueuses. De plus, il a été démontré que les patients souffrants de pathologies respiratoires, comme l'asthme allergique, présentent des modifications anormales de populations bactériennes du microbiote pulmonaire. Ces modifications, nommées communément dysbioses, suggèrent que le microbiote pulmonaire peut jouer un rôle dans le développement et/ou l'exacerbation de ces pathologies.

Notre hypothèse est que le microbiote, de manière générale, est également capable d'induire un phénomène d'immunomodulation au niveau des voies respiratoires et notamment dans les poumons. Dans ce contexte, nous pensons que l'infection RSV peut être impactée par ce processus d'immunomodulation.

Afin de valider notre hypothèse, nous proposons dans ce projet d'infecter avec le RSV-luciférase (virus pouvant être détecté par bioluminescence) humain, en période néonatale et à l'âge adulte, des souris C57Bl/6 possédant un microbiote exempt de pathogènes (EOPS) et axéniques (souris dépourvues de microbiote de manière générale). Cette action nous permettra d'évaluer l'effet de la présence du microbiote sur la réplication virale et la réponse immunitaire des voies respiratoires. Cela nous permettra également de comparer les réponses obtenues entre la souris adulte et le nouveau-né et donc peut-être de comprendre pourquoi la réponse immunitaire est différente entre ces deux périodes de la vie.

Le recours aux animaux est indispensable pour répondre aux questions scientifiques du projet qui s'échelonnent sur une période de 5 ans et nécessitera au maximum 432 souris (nouveau-nés et adultes). Ce nombre est justifié par le fait que la pertinence d'une expérience repose sur la réalisation de tests statistiques pour attester d'une différence biologique ainsi que l'inclusion de groupes expérimentaux témoins.

Les souriceaux élevés avec leur mère (2 portées/cage) ainsi que les souris adultes auront à disposition du matériel pour nidifier (papier mouchoir) depuis leur naissance jusqu'au sevrage et seront observés tous les jours par le personnel de l'animalerie jusqu'à leur autopsie. Les animaux seront anesthésiés avec une solution de kétamine/Xylazine en intrapéritonéale puis infectés par voie intranasale (10µL/ souriceaux et 50µL/souris adultes). Afin d'étudier l'influence du microbiote sur l'infection RSV, nous devons réaliser les infections intranasales dans 2 animaleries différentes. Lors de l'expérimentation, il y aura 2 groupes de souris par animaleries ceux traités avec la solution contrôle et ceux infectés par le RSV. Ce nombre de groupes sera multiplié par 2 car nous aurons 2 temps de cinétiques par expérimentation (J1 et J4 post-infection pour les souris adultes et J1 et J2 post-infection pour les souriceaux). Les animaux seront donc euthanasiés par une surdose d'anesthésiques administrés en voie parentérale à des temps précis. A l'autopsie, des lavages broncho-alvéolaires seront réalisés et les poumons ainsi que les fosses nasales seront prélevés afin d'analyser différents paramètres immunologiques.

14757 La myopathie de Duchenne est une maladie génétique qui touche le muscle chez l'enfant, provoquant une faiblesse musculaire généralisée et évolutive. Les patients sont contraints à l'usage du fauteuil roulant vers l'âge de 10 ans, et décèdent d'insuffisance respiratoire ou cardiaque vers

l'âge de 30 ans. Il n'existe pas, à ce jour, de solution thérapeutique sur le marché pour la myopathie de Duchenne. Néanmoins, il est maintenant clairement établi qu'un traitement à base de corticostéroïdes, initié dès le plus jeune âge chez les patients, leur apporte un bénéfice, en permettant de retarder d'un à trois ans la perte d'ambulation, et de retarder également la survenue de l'insuffisance respiratoire. Désormais, la quasi-totalité des patients atteints par cette maladie est donc sous corticostéroïdes au long cours, y compris les patients inclus dans des essais cliniques. Il existe différents modèles de cette maladie pour travailler sur l'élaboration des médicaments, depuis les modèles *in vitro*, jusqu'aux modèles animaux. Toutefois, seul le contexte du chien atteint spontanément par cette maladie, notamment le chien GRMD (golden retriever muscular dystrophy), reproduit de manière fidèle les manifestations cliniques et fonctionnelles rencontrées chez les patients. Lorsqu'un médicament a fait ses preuves sur des modèles *in vitro* puis dans le modèle murin, et qu'il a des chances réelles d'arriver au chevet du patient, son efficacité chez le chien GRMD permet d'envisager un passage en clinique prometteur, du fait de la valeur translationnelle forte des données obtenues chez les chiens. Jusqu'à aujourd'hui, les chiens traités dans le cadre d'essais précliniques étaient comparés à des chiens non traités. La gestion médicale des patients atteints de myopathie de Duchenne évoluant vers une généralisation de l'usage des corticostéroïdes, il apparaît pertinent que son modèle préclinique soit positionné dans un contexte similaire, afin de répondre au plus près aux questions de niveaux d'efficacité attendus des différentes approches thérapeutiques testées (thérapie génique, cellulaire, pharmacologique). Cette étude a donc pour objectif de décrire de manière quantifiée et exhaustive l'effet d'un traitement à base de prednisone, à la dose utilisée chez les patients (0.75 mg/kg/jour), administré au long cours chez les chiens GRMD. Un effet bénéfique sur l'ensemble du phénotype est attendu, et cette étude permettra de déterminer précisément le niveau de cet effet, constituant ainsi une base de comparaison pour d'autres thérapies. Dix chiens GRMD seront traités de l'âge de 2 à 24 mois, et seront comparés à dix chiens GRMD et dix chiens sains non traités, suivis de la même manière et sur la même période. Ce nombre d'animaux a été réduit au minimum permettant une représentation de l'ensemble de la variabilité phénotypique observée dans une population de chiens GRMD. Les chiens seront évalués à l'aide de nombreuses mesures non invasives développées, pour la plupart d'entre elles, à partir de méthodes utilisées chez les patients et adaptées aux chiens. Les chiens seront hébergés en petits groupes d'âges proches et de tempéraments compatibles, avec accès à un lieu de couchage, des plateformes et des jeux variés. Ils seront sortis quotidiennement en groupes plus larges dans des espaces extérieurs. Des moments d'interactions avec l'homme seront ménagés quotidiennement (temps de jeux, caresses). Ils bénéficieront d'un suivi vétérinaire quotidien afin de suivre au plus près les éventuelles complications liées à leur maladie. Des points limites précis et suffisamment précoces pour leur éviter toute souffrance prolongée et inutile ont par ailleurs été définis. Les chiens sains seront mis à l'adoption en fin de suivi. Enfin, de la même manière qu'il est désormais inenvisageable de ne pas traiter un enfant atteint par cette maladie par des corticostéroïdes, cette étude servira de base pour les prochaines études précliniques, qui inclueront très probablement non plus des chiens GRMD, mais des chiens GRMD dont la maladie sera atténuée par ce traitement.

14758 Ce projet a pour but d'améliorer les techniques de thérapies cellulaires dans le traitement de la maladie de Parkinson. La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative liée essentiellement à une perte progressive des neurones dopaminergiques (DA) de la substance noire compacta qui projettent sur le striatum dorsal. Cette neurodégénérescence est associée à des dépôts anormaux d'une protéine, l'alpha-synucléine, qui s'accumule pour former des inclusions (corps de Lewy). Chez les patients parkinsoniens, des essais cliniques de transplantation intrastriatale de neurones DA a abouti à certaines améliorations, cependant insuffisantes pour l'utilisation de cette approche en routine. Ceci est principalement dû à 1) la quantité limitée de cellules à transplanter, ainsi qu'à une standardisation difficile et des problèmes éthiques engendrés par l'utilisation de neurones fœtaux humains, 2) une efficacité thérapeutique limitée, en partie liée à la position ectopique des greffes. En effet, chez certains patients, après l'autopsie réalisée 10 à 22 ans après une transplantation striatale, une partie des neurones greffés contenaient des agrégats d' α -synucléine, similaires à ceux observés dans le cerveau de l'hôte.

Notre hypothèse est que le site ectopique de la greffe expose les neurones greffés à un microenvironnement qui n'est pas favorable (déficit en facteurs neurotrophiques, absence d'innervations spécifiques), les rendant plus vulnérables au processus pathologique qu'est le transfert d' α -synucléine de l'hôte vers le greffon.

Dans ce projet, nous proposons, dans un modèle animal de la maladie de Parkinson associée à la formation d'agrégats d' α -synucléine, d'étudier :

1) L'impact fonctionnel d'une greffe striatale (ectopique) ou nigrale sur la fonction motrice de l'animal.

2) La possibilité du transport des agrégats d' α -synucléine de l'hôte vers les nouveaux neurones dopaminergiques greffés, soit en position homotopique (au niveau de la substance noire) soit en position ectopique (au niveau du striatum), sera analysée par des techniques d'immunohistochimie et microscopie confocale.

3) L'intégration du transplant striatal ou nigral au sein du réseau de l'hôte sera analysée par une technique couplant l'optogénétique, l'électrophysiologie et le comportement.

Dans la première partie du projet, les cellules greffées seront issues du mésencéphale ventral d'embryons de souris transgéniques TH-GFP prélevés au 12ème jour de la gestation.

Dans la deuxième partie, les cellules greffées seront des progéniteurs dopaminergiques spécifiques de la substance noire compacta, issus de cellules pluripotentes humaines, dans lesquelles une opsine (Channelrhodopsine ou Archeorhodopsine) sera exprimée. Cette technique nous permettra d'étudier de manière plus spécifique l'intégration des neurones greffés au sein du réseau neuronal.

Un protocole complet nécessite l'utilisation de 680 souris.

La règle des 3R a été prise en considération. De nos jours, il n'est pas encore possible de modéliser un cerveau de mammifère *in vitro*, qui nous permettrait d'étudier la transplantation et donc de remplacer cette étude par des expériences *in vitro*. Nous avons réduit au maximum le nombre d'animaux nécessaires en expérimentation tout en s'assurant d'en avoir le nombre suffisant pour avoir une étude interprétable sur le plan statistique. Enfin, la notion de raffinement a été appréhendée à travers les conditions d'expérimentation qui sont optimisées (sédation et analgésie pour toute manipulation douloureuse ou stressante) afin de s'assurer du bien-être des animaux tout au long des procédures expérimentales.

14759 Le foie est un organe majeur dans la régulation du métabolisme. Chez l'Homme comme chez la souris, il stocke des nutriments sous diverses formes, et joue un rôle de tampon dans la régulation de l'homéostasie énergétique. Les individus obèses ont tendance à développer une stéatose, c'est-à-dire à présenter une forte accumulation de graisses dans le foie. Cette pathologie est de plus en plus répandue, dans le contexte d'épidémie d'obésité mondiale actuelle.

Le tissu adipeux blanc est le principal organe qui stocke les graisses et les libère sous forme d'acides gras dans la circulation sanguine. Ces acides gras sont ensuite consommés par les autres cellules de l'organisme, notamment le foie, à des fins énergétiques. Une trop forte concentration d'acides gras dans le foie perturbe son fonctionnement et induit une inflammation pouvant conduire à la fibrose et au cancer hépatique. La compréhension des mécanismes conduisant à l'inflammation hépatique représente donc un enjeu important.

Dans ce projet, nous souhaitons approfondir les connaissances sur les effets d'une libération importante d'acides gras par le tissu adipeux sur l'inflammation hépatique. Nous étudierons en particulier la voie de signalisation Myd88 (myeloid differentiation primary response 88) qui joue un rôle majeur dans l'initiation des réponses inflammatoires du foie.

Pour cela, nous utiliserons des souris dont le gène Myd88 a été invalidé par ingénierie génétique spécifiquement dans le foie. Les institutions internationales recommandent de prendre en compte l'effet du sexe dans les pathologies métaboliques puisqu'il existe chez l'Homme un fort dimorphisme sexuel. Nous étudierons donc le rôle de la voie Myd88 dans les 2 sexes.

Ces souris, en comparaison d'animaux contrôles de type sauvage, seront soumises à diverses conditions afin d'étudier le rôle de Myd88 lors d'un afflux d'acides gras provenant du tissu grasseux vers le foie.

Ces différentes conditions devraient augmenter la libération d'acides gras circulants chez ces animaux. Nous mettrons en évidence ces perturbations en réalisant des bilans sanguins.

Des analyses de pointe (transcriptomiques, lipidomiques, biochimiques et métabolomiques) seront réalisées sur des prélèvements post-mortem de différents tissus (foie, tissus adipeux brun et blanc). Nous utiliserons uniquement des souris adultes. Nous prévoyons d'utiliser, à raison de 12 animaux par groupe, par sexe, et au vu du nombre d'études à mener, 288 animaux sur 2 ans. Basé sur les données de la littérature et des études antérieures du laboratoire, ce nombre d'animaux est le nombre minimum nécessaire mais suffisant afin d'obtenir des résultats exploitables. L'utilisation de l'animal entier est indispensable car le projet porte sur le dialogue entre plusieurs organes dans la régulation des voies métaboliques et inflammatoires. De plus, la souris est un modèle de choix car adapté aux mécanismes que nous étudions et qui nous permet d'invalider une protéine d'intérêt dans un organe en particulier. Ainsi nous ne pouvons pas utiliser de méthodes de remplacement comme alternative pour cette étude. Nous veillerons au bien-être des animaux tout au long des études en leur assurant les meilleures conditions d'hébergement (hébergement collectif), dans un environnement contrôlé, une surveillance quotidienne par le personnel soignant et des enrichissements du milieu de vie (cabanes inox et ouate dans les cages). Si un animal présente un signe quelconque de souffrance, il sera aussitôt retiré de l'étude.

14760 Contexte et objectifs :

Le muscle du squelette est capable de se régénérer en cas de lésion. Cette capacité est due à la présence de cellules souches (Pax7+), appelées cellules satellites, situées à proximité des fibres musculaires. Suite à une lésion, les cellules inflammatoires ayant infiltré le tissu envoient des signaux aux cellules satellites activant ainsi successivement leur prolifération, leur différenciation puis leur fusion, ce qui permet le renouvellement des fibres musculaires endommagées. L'utilisation des cellules satellites dans le développement de nouvelles stratégies de thérapie cellulaire pour améliorer la fonction musculaire dans le cadre de myopathies mais également au cours du vieillissement ou lors de traumatismes musculaires est envisagée.

Les récepteurs nucléaires Rev-erbA et Rev-erbB contrôlent l'horloge biologique et ont de nombreux rôles dans la régulation du métabolisme énergétique. Des résultats indiquent que chez les souris déficientes pour Rev-erbA, la régénération musculaire est affectée. D'autre part, Rev-erbA et Rev-erbB sont fortement exprimés dans les cellules satellites quiescentes alors que leur expression diminue brutalement dès lors qu'elles sont activées.

L'objectif de ce projet est de démontrer, grâce à des modèles murins d'invalidation ou de sur-expression, l'implication de Rev-erbA et Rev-erbB dans la régulation de la régénération musculaire en évaluant spécifiquement leur rôle dans la cellule satellite et dans les cellules inflammatoires. Ce projet fera donc avancer les connaissances sur les fonctions physiologiques des Rev-erbs.

Pour la réalisation de ce projet, des injections intramusculaires de mytoxines ou de solutions chimiques (BaCl₂) seront réalisées dans le Tibialis Antérieur des différents modèles de souris perte et gain de fonction pour les Rev-erbs, sous anesthésie générale, afin d'induire la régénération musculaire. Les muscles seront ensuite prélevés à différents moments après la blessure pour diverses analyses.

Justification de l'expérimentation décrite et méthodes mises en œuvre pour réduire le nombre d'animaux

La régénération musculaire est un processus mis en œuvre de manière spontanée et chronique chez des patients atteints de myopathies. Afin d'induire le processus de régénération chez la souris différents modèles ont été développés. Ils sont basés soit sur l'utilisation de mytoxines de venin de serpent (la notexine et la cardiotoxine), soit sur l'utilisation du Chlorure de baryum (BaCl₂) pour induire une blessure chimique. Ces modèles de régénération musculaire présentent des différences en terme de réponse inflammatoire par exemple. Afin d'étudier le rôle des Rev-erbs dans la

régénération musculaire, il est donc primordial d'avoir recours à au moins deux modèles de régénération aigue, comme cela est de plus en plus demandé.

Les blessures serviront à étudier le résultat de la communication entre les cellules satellites et les cellules immunitaires dans un contexte patho-physiologique. Cependant, puisqu'il est possible d'isoler ces cellules et de les étudier *in vitro*, de nombreux paramètres seront analysés dans ce sens afin de réduire le nombre d'animaux utilisés. En effet, les cellules satellites s'activent de manière spontanée lorsqu'elles sont sorties de leur niche et mises en culture. D'autre part, nous sommes en train de développer des systèmes de co-cultures qui nous permettront d'étudier la communication entre cellules satellites et cellules immunitaires *in vitro*. Ainsi, les études de régénération *in vivo* ne seront utilisées que pour répondre aux questions qui ne peuvent l'être dans ces expériences *in vitro*.

De plus, des procédures standardisées nous permettront non seulement de diminuer la variabilité mais aussi de comparer les résultats des expériences menées, diminuant ainsi le nombre d'animaux étudiés. Le nombre total d'animaux sera de 3076 souris.

Méthodes mises en œuvre pour atténuer la souffrance ou le stress induit par les manipulations, et améliorer le bien-être des animaux :

Afin d'atteindre l'objectif, nous évaluerons la conséquence d'une invalidation ou d'une sur-expression de Rev-erb introduite au niveau du corps entier ou dans des cellules ou organes spécifiques (souris génétiquement modifiées). Ces manipulations n'engendrent, par elles-mêmes, aucune souffrance. Il est important, notamment puisque la part inflammatoire est importante dans nos modèles, que les animaux soient maintenus dans des conditions d'hébergement dépourvus de stress, et que nos animaux soient maintenus dans un statut sanitaire excellent. Ainsi, la souffrance potentielle engendrée par les procédures mises en œuvre sera prise en charge grâce à l'utilisation d'analgésiques et d'anesthésiques dès que nécessaire. La procédure d'euthanasie sera mise en œuvre sous anesthésie (animal inconscient). Enfin, le bien-être de l'animal depuis sa naissance jusqu'à sa mort sera pris en compte grâce à un environnement contrôlé dépourvu de germes pathogènes, la présence d'abris et de jeux dans les cages, une surveillance quotidienne de l'état de santé des animaux, et la prise en compte de tout signe physique de stress ainsi que de la hiérarchie sociale.

L'ensemble des procédures décrites (blessures par injection de venin et par le Chlorure de barium (BaCl₂) sont des procédures utilisées par la communauté travaillant sur la régénération musculaire. Un des membres de notre équipe a importé ces techniques de son laboratoire d'accueil où le projet a déjà été revu et accepté par le comité local d'éthique en expérimentation animale en février 2013.

14761 La maladie de Parkinson est une pathologie neurodégénérative dont les symptômes moteurs résultent de la perte progressive de neurones au sein de la substance noire produisant de la dopamine. Afin de reproduire cette pathologie chez le rongeur, il est possible d'exprimer des gènes, tel que celui de l'alpha-synucléine, causant la pathologie chez l'être humain. Chez la souris, cette modélisation peut être réalisée par l'injection dans le cerveau de vecteurs viraux exprimant ce gène ou par l'obtention d'animaux transgéniques chez lesquels le gène a été introduit dans le génome. Paradoxalement, ces deux approches ont donné des résultats différents. L'injection d'un vecteur viral dans le cerveau d'une souris adulte induit une pathologie très marquée tandis que les souris transgéniques montrent des signes marginaux de pathologie. A l'inverse, le maintien d'une colonie de souris transgéniques permet une obtention très simple du modèle alors que l'injection intracérébrale requiert une excellente expertise en chirurgie. Ainsi, il est essentiel de poursuivre l'amélioration des modèles animaux afin de les rendre de plus en plus pertinents, prédictifs et reproductibles tout en restant relativement simple à obtenir afin de permettre leur accès. Ces nouveaux modèles permettraient également de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques de la maladie de Parkinson, d'identifier et de valider des thérapies innovantes, et de répondre à des questions concernant la modélisation chez le rongeur.

La caractérisation et la standardisation d'un nouveau modèle préclinique sera réalisée par des analyses comportementales, histologiques, biochimiques et moléculaires.

Ce projet est composé de 2 procédures expérimentales et requerra l'utilisation d'un maximum de 556 souris sur 5 ans.

Réduction : Ce nombre d'animaux a été déterminé par une approche statistique de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en en gardant suffisamment pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées. Un suivi longitudinal permettra de répéter certaines mesures afin de diminuer le nombre d'animaux nécessaires par groupe.

Raffinement : Le projet implique la mise en place d'un état pathologique chez le rongeur avec une approche lésionnelle de classe modérée. Ces injections par voie intraveineuse seront effectuées sous anesthésie générale. L'état de santé des animaux ainsi que leur niveau de douleur sera surveillé et évalué tout au long de l'expérience. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

Remplacement : Ce projet a pour but de mesurer des marqueurs pathologiques, notamment comportementaux, au cours du développement de la maladie de Parkinson. De ce fait, il est impossible de remplacer notre approche *in vivo* par un modèle cellulaire ou une simulation informatique.

14762 Ce projet s'inscrit dans le programme d'enseignement de l'anatomie vétérinaire et a pour but de fournir des cadavres de moutons spécialement préparés afin de permettre leur dissection sur une durée de deux semaines lors des séances de travaux pratiques.

L'Anatomie représente une discipline fondamentale dans l'exercice de la médecine vétérinaire car elle fournit aux étudiants les outils nécessaires à la pratique des disciplines biologiques affines qui leur seront enseignées plus tard dans le cursus. L'intérêt des supports iconographiques d'enseignement reste limité car ils ne sollicitent que la vue de l'étudiant; or l'apprentissage de l'anatomie doit obligatoirement être actif et passer par le toucher, d'où la nécessité des travaux pratiques de dissection. Ces derniers, réalisés sur moutons adultes de réforme (i.e. animaux initialement destinés à l'abattoir mais finalement jugés impropres à la consommation), permet l'étude de l'anatomie des viscères (avec étude des particularités des Ruminants), des muscles, des articulations et des nerfs.

La stratégie mise en place pour réduire le nombre d'animaux est de compléter les dissections par l'utilisation d'autres supports pédagogiques (mannequins, pièces anatomiques issues de collections), amenant ainsi à l'utilisation de seulement 1 animal pour un groupe de 6 à 7 étudiants, soit l'utilisation de 36 ovins par année universitaire, au total 180 ovins sur 5 ans.

La stratégie utilisée pour diminuer la douleur, la souffrance et l'angoisse liées à la procédure est de réaliser une anesthésie et une analgésie des animaux.

Il est pour l'instant difficile de remplacer l'euthanasie des animaux de réforme par l'utilisation de cadavres d'animaux euthanasiés pour raison médicale ou morts de manière naturelle; et ce, pour des raisons structurelles (nombre insuffisant) et pédagogiques (les organes et leurs rapports peuvent être sévèrement modifiés chez des animaux malades).

14763 L'obésité, actuellement considérée comme une épidémie, touche plus de 1,9 milliards d'adulte dans le monde. Cette pathologie, caractérisée par une surcharge pondérale, est également associée à une augmentation des lipides (cholestérol et triglycérides) dans le sang et dans le foie, mais aussi à des anomalies de la régulation de la glycémie menant au développement d'un diabète de type 2.

Une équipe belge a démontré récemment les rôles bénéfiques d'une bactérie intestinale, *Akkermansia muciniphila* (AKK) dans le développement de l'obésité et le diabète de type 2. En effet, cette bactérie est retrouvée en plus petite quantité chez les patients obèses et/ou diabétiques. Au contraire, sa supplémentation entraîne une amélioration de l'état de la barrière intestinale ainsi que des paramètres métaboliques tels qu'une diminution de l'accumulation de graisses et de l'inflammation dans le tissu adipeux et une amélioration de la sensibilité à l'insuline.

Il est établi que les bactéries de la flore intestinale exercent un rôle important dans la fermentation de certains composés alimentaires, comme les fibres et les protéines. En effet, cette fermentation fournit des métabolites, dont des acides gras à courtes chaînes, ou encore des intermédiaires du

cycle de Krebs, qui peuvent ensuite être utilisés par l'intestin pour produire du glucose. De façon intéressante, certains de ces métabolites induisent la production intestinale de glucose (PIG), une fonction connue pour avoir des effets bénéfiques comparables à ceux d'AKK.

Le but de cette étude est de déterminer si les effets bénéfiques métaboliques d'AKK sont associés à une induction de la PIG.

Pour vérifier cette hypothèse, nous envisageons d'étudier les effets métaboliques d'un réensemencement du microbiote chez des souris contrôles et des souris dépourvues de PIG. Ces animaux transgéniques ne présentent aucun signe de stress, ni de douleur par rapport aux souris contrôles. L'ensemble des souris seront élevées et hébergées par groupe de 3 par cage en milieu enrichi (coton de nidation, bois à ronger) et contrôlé.

Une première étude pilote réalisée sur 2 semaines nous a permis de confirmer certains effets bénéfiques à court terme d'AKK sur le métabolisme chez des souris contrôles et de les relier avec l'induction de la PIG. En effet, en adéquation avec notre hypothèse de départ, ces effets ne sont plus visibles chez les souris dépourvues de PIG. Cette étude n'a entraîné aucun effet délétère chez l'animal, tant au niveau du stress ou de la douleur avec une prise de poids normale.

Au vu du succès de cette première étude, nous aimerions réaliser un protocole similaire sur un nouveau groupe de souris mais cette fois pendant 4 semaines afin d'observer si les effets bénéfiques à plus long terme d'AKK sont également dépendants de la PIG.

Ces études jouent un rôle clé dans la compréhension des mécanismes impliqués dans la régulation du métabolisme par le microbiote intestinal, un sujet majeur de santé publique.

Comme précédemment, afin d'observer plus facilement des effets bénéfiques sur l'organisme, nous nous placerons dans le contexte d'un régime délétère en nourrissant les souris avec un régime riche en gras (High Fat = HF) pendant les 4 semaines de réensemencement d'Akk par voie orale. Cette durée est néanmoins insuffisante pour entraîner l'apparition d'un état pathologique (obésité ou diabète).

Cette étude implique une réponse intégrée de l'ensemble de l'organisme, ce qui justifie le recours à l'animal.

Ce projet sera réalisé selon le respect de la règle des 3R

Par souci de raffinement les procédures sont maîtrisées au sein du laboratoire et la connaissance du modèle animal permet de définir des points limites (prostration...). Le suivi du bien-être des animaux sera réalisé régulièrement en étudiant leur poids, leur prise alimentaire et leur comportement afin d'identifier tout individu en souffrance. Le nombre total d'animaux (96 souris), a été calculé au plus juste afin de réduire au maximum le nombre de souris utilisées. La nécessité d'avoir recours à des animaux dans ce projet est d'obtenir une réponse de l'organisme tout entier en temps réel, ce qui n'est pas réalisable en modèle cellulaire.

14764 Les lymphocytes T sont des cellules immunitaires qui jouent des rôles centraux dans les défenses contre les agents pathogènes, mais aussi dans les interactions symbiotiques avec les bactéries commensales colonisant les muqueuses et la surface du corps. Dans ce projet de recherche fondamentale, nous nous intéressons à une population de lymphocytes T reconnaissant les bactéries intestinales, et impliquée dans de nombreuses maladies telles que l'obésité, la sclérose en plaque, le diabète, les maladies inflammatoires de l'intestin et le syndrome métabolique. Les fonctions des lymphocytes T que nous étudions sont acquises au cours de leur développement dans une glande appelée thymus, et qui a donné leur nom aux cellules T. Comprendre les mécanismes de développement des lymphocytes T dans le thymus est essentiel pour comprendre leur fonction, et pour manipuler ces cellules à des fins thérapeutiques.

Des études précédentes ont montré que le développement des lymphocytes T d'intérêt repose sur l'expression d'un seul gène. Dans ce projet, nous cherchons à déterminer quelles cellules du thymus contrôlent la maturation des lymphocytes T.

Deux types de cellules sont potentiellement impliquées dans le développement des lymphocytes T, et ces deux types peuvent être distingués par leur sensibilité aux radiations les cellules épithéliales

sont résistantes aux rayons X, tandis que les cellules hématopoïétiques sont sensibles à l'irradiation. Nous allons exploiter cette différence de sensibilité pour distinguer le rôle de ces deux types de cellules dans le développement des lymphocytes T d'intérêt.

Cette étude permettra de mieux comprendre comment les lymphocytes T se développent et acquièrent leurs fonctions dans le thymus.

Nombre d'animaux pour ce projet : 18 souris. Ce projet se conforme à la règle des 3R qui régit l'expérimentation animale

Remplacer dans une étude préliminaire, nous avons déterminé *in vitro* la capacité des différentes cellules du thymus à exprimer le gène responsable du développement des lymphocytes T d'intérêt. Cependant ces données ne permettent pas de conclure quant au rôle de ces cellules *in vivo*. Il n'existe pas de méthodes alternatives pour réaliser ce travail qui nécessite l'analyse du thymus de souris irradiées aux rayons X.

Réduire les résultats attendus à l'issue de ce projet n'ont pas été publiés à ce jour dans la littérature scientifique. Le nombre de souris à utiliser (18) a été calculé pour obéir aux minima nécessaires à des analyses statistiques valides, condition nécessaire pour une interprétation biologique des résultats.

Raffiner Les animaux seront suivis quotidiennement afin d'assurer leur bien-être et pour monitorer les éventuels signes de douleur, de souffrance ou de stress. Des points-limites ont été établis.

14765 L'autisme est un trouble du développement caractérisé par des interactions sociales et une communication verbale et non verbale altérées, en conjonction avec un intérêt restreint pour le milieu environnant et des mouvements stéréotypés et répétitifs. L'incidence de l'autisme, de l'ordre de 1%, en fait un problème de santé public majeur. Il existe de nombreuses données scientifiques suggérant que des anomalies génétiques ou des altérations environnementales et physiologiques durant la grossesse et la période néonatale sont à l'origine de l'autisme. En plus, des données cliniques ont aussi montre que des altérations physiologiques pendant l'accouchement peuvent augmenter l'incidence des maladies neurodéveloppementales telles que l'autisme cependant, ces résultats restent controversés. Notre objectif est de déterminer chez la souris les effets de l'altération des systèmes neuronaux pendant la période périnatale, par manipulation physiologique de certains types neuronaux chez la mère pendant l'accouchement et d'évaluer les conséquences comportementales autistiques chez la descendance. Ce projet utilisera 320 souris sur une période de 4 ans.

Pour manipuler spécifiquement l'activité des neurones d'intérêt chez des souris femelles, des molécules photo-stimulables (rassemblées dans un vecteur viral) seront injectées dans ces neurones via une chirurgie qui requiert une micro-perforation du crâne. Dans la même chirurgie, des fibres optiques seront implantées chroniquement dans la structure cérébrale à manipuler.

Avant le début de l'expérience, les fibres optiques implantées dans le cerveau de l'animal sont connectées à la source de lumière (un laser dans notre cas). Cette connexion est réalisée en quelques secondes et est totalement indolore pour les souris. Pour ne pas déranger les animaux, les stimulations lumineuses se feront à distance. Finalement la descendance de la mère manipulée sera testée pour le comportement autistique une fois adulte dans des tâches comportementales adaptées à leur espèce. Pour cela les animaux sont laissés libres dans le dispositif où les tests comportementaux se déroulent. Ce type de procédure n'engendrera ni douleur ni contrainte chez les animaux.

Concernant l'application de la règle des 3Rs. Pour appliquer au mieux les principes de réduction et de raffinement nous analyserons nos données au fur et à mesure des expériences pour éviter des expériences inutiles et les mêmes animaux seront utilisés ou testés pour différentes conditions afin d'en minimiser leur nombre. Les animaux seront hébergés au minimum par deux ou en groupes sociaux dans des cages standards équipées de matériaux de nidification en plus de l'enrichissement de base (ex. tunnels) et dans un environnement contrôlé avec accès ad libitum à la nourriture et à l'eau. Avant toute chirurgie ou manipulation douloureuse, une combinaison d'anesthésique et sédatif sera administrée, ainsi qu'un analgésique. En post-opératoire, les souris

auront au moins une semaine pour se rétablir. Pendant la chirurgie et tout au long des expériences, leurs paramètres comportementaux, physiques et physiologiques seront observés attentivement et nous ferons appel à notre vétérinaire si nécessaire. Pour décrire le point limite et porter ainsi la douleur des souris à son minimum, nous utiliserons une grille de scores. Finalement, pour soulager le stress pendant les expériences, les animaux seront d'abord familiarisés avec l'expérimentateur et habitués à la salle d'expérimentation. Concernant le remplacement, les études que nous proposons sur les effets des altérations neuronales périnatales et les conséquences comportementales chez la descendance ne peuvent être reproduites ni étudiées dans des modèles de cultures cellulaires *in vitro*.

14766 Les bactéries ont la capacité s'adapter en développant des moyens de résister à l'action des antibiotiques censés les détruire. Plus un antibiotique est capable de tuer un large spectre de variétés bactériennes, plus le nombre d'espèces qui développeront des résistances sera grand. L'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques est un problème de santé publique mondiale qui ne fait qu'augmenter avec l'utilisation d'antibiotiques et surtout à spectre de plus en plus large. Ces résistances risquent ainsi de mettre le traitement d'une infection en échec, aussi des solutions doivent être trouvées. Parmi les solutions, il y a eu la mise au point de molécules assez puissantes pour vaincre toutes ces résistances. Cependant de telles molécules dites de dernier recours n'ont pas été épargnées par l'émergence de bactéries dites multi-résistantes. Une autre stratégie consisterait au contraire à limiter l'usage des antibiotiques de large spectre pour tenter de retarder voire éviter l'émergence de résistances, par exemple en effectuant une désescalade depuis un antibiotique à large spectre vers un antibiotique ciblant plus précisément certaines bactéries (spectre étroit).

La stratégie de désescalade a été peu étudiée et nous n'avons pas de preuve de son efficacité. Peu de publications chez l'homme portent sur la désescalade et leurs résultats sont discordants et controversés. Certaines montrent même que la désescalade antibiotique entraîne une augmentation de l'émergence de résistance bactérienne chez l'homme en particulier au sein même des bactéries non pathogènes déjà présentes dans notre organisme et constituant notre microbiote. Nous n'avons pas trouvé d'étude expérimentale qui ait mesuré les effets de la désescalade antibiotique sur l'émergence de germes multi-résistants dans les microbiotes aussi l'objectif du projet est de répondre à la question de l'efficacité de la désescalade antibiotique sur l'acquisition d'antibiorésistance *in vivo*.

Sur un modèle murin d'infection abdominale, nous étudierons 8 séries d'animaux soit 1 série pour l'étude pilote, 1 série de souris non infectées témoins (SHAM), 6 séries de souris infectées dont 1 série qui n'aura pas de traitement antibiotique (contrôle), et 5 autres ayant des stratégies de traitement différentes incluant une désescalade.

Le critère de jugement principal sera l'apparition de résistances aux antibiotiques au sein de la flore fécale prélevée en post mortem (analyse du résistome par des méthodes de culturomique et métagénomique sur les selles). Le critère de jugement secondaire sera l'étude de la mortalité et la morbidité mesurées par la perte de poids, la date et le nombre d'animaux présentant un point de limite éthique.

L'étude pilote permettra de déterminer l'espèce de souris la plus adaptée mais également de cibler sur le plan éthique les temps d'apparition des points limites liés à l'infection, de connaître les besoins en médications antalgiques (dose et durée du traitement antalgique).

Plusieurs échantillons fécaux seront recueillis chez la même souris afin de réduire le nombre d'animaux utilisés. Les premiers échantillons fécaux seront recueillis avant l'induction du sepsis sur des selles spontanément émises. Tous les échantillons post procédure seront effectués en post mortem afin d'obtenir des échantillons étagés rectaux, sigmoïde colon transverse, sans soumettre la souris à une nouvelle procédure douloureuse. L'intérêt de multiplier ces mesures au cours d'une même expérimentation est de réduire au maximum le nombre de souris à inclure dans l'étude, afin de respecter la règle des 3R.

Le nombre total de souris nécessaires pour obtenir des résultats significatifs est de 110 souris. Par analogie aux études explorant le resistome chez des animaux (poulets et souris) dont les groupes sont composés de 10 à 20 individus, nous proposons de minimiser le nombre de souris à un total de 10 souris par groupe, sauf pour l'étude pilote, où 20 souris par espèce et par sexe (40 souris au total pour l'étude pilote) seront nécessaires.

L'expérimentation sur souris est nécessaire pour l'étude du microbiote car le microbiote résulte d'un équilibre entre le monde bactérien et le système immunitaire du sujet à l'interface selles-muqueuse intestinale sous l'effet des apports extérieurs alimentaires et des enzymes digestives. Il est indispensable pour son étude d'avoir un système digestif enzymatique et immunitaire intègre ce qui n'est possible qu'en utilisant des animaux vivants. Il est pour l'instant nécessaire de travailler sur un modèle animal puisqu'aucune expérience *in vitro* n'a pu reproduire de microbiote intestinal semblable à celui des vertébrés.

Cette étude sera placée sous la règle des 3R qui consiste à 1) « Réduire » au minimum le nombre de souris utilisé (n=110) pour ne pas exposer un nombre inutilement trop important d'animaux à l'expérimentation tout en garantissant une validité statistique aux résultats obtenus. 2) « Raffinement », avec un environnement des souris qui sera enrichi pour améliorer au maximum le bien-être animal, un nombre de souris (n=5) qui sera limité par cage, des conditions dans les cages proches de celle de l'élevage, un suivi quotidien des souris pour une surveillance étroite de l'apparition de points limites. La douleur sera contrôlée par l'injection sous cutanée de tramadol, en sous cutanée. Afin de respecter la règle des 3R, les antalgiques seront administrés avec les antibiotiques, en une seule et même injection, afin de limiter les procédures douloureuses. Ils seront donc injectés à la fréquence de l'antibiothérapie, variable selon le groupe. Le tout sera réalisé par un personnel habilité pour l'expérimentation animale. 3) « Remplacer » aucune autre alternative n'étant suffisamment pertinente ni possible pour évaluer l'efficacité de la désescalade antibiotique. L'utilisation de ce modèle animal se justifie pour reproduire les paramètres (diversité, trophicité et exposition aux antibiotiques) du microbiote humain. A la fin du protocole expérimental, le sang, les organes et les selles seront conservés dans nos banques d'organes afin de mutualiser les échantillons et limiter le nombre d'animaux soumis à expérience au sein du laboratoire.

14767 Les cancers du sein sont la première cause de décès liés au cancer dans le monde occidental chez la femme. Ces cellules tumorales possèdent un fort potentiel à coloniser des organes secondaires comme les poumons. Un challenge majeur dans le traitement des cancers du sein est leur résistance aux traitements chimio-thérapeutiques. Alors que des facteurs intrinsèques à la cellule tumorale, comme ses caractéristiques génétiques peuvent être responsables de la résistance aux traitements, il est maintenant reconnu que le microenvironnement tumoral module la réponse aux traitements. Les traitements chimio-thérapeutiques peuvent modifier le microenvironnement tumoral et jouer un rôle dans la résistance des cellules tumorales. Le but du projet est d'étudier comment cet environnement modifié par le traitement thérapeutique favorise la résistance des cellules cancéreuses. Dans ce contexte, nous étudions le rôle des neutrophiles, cellules du système immunitaire, notamment des Neutrophil Extracellular Traps (NETs). Les neutrophiles sont maintenant reconnus pour leurs propriétés pro-tumorales, cependant leur rôle dans la résistance aux traitements reste obscur. Nos résultats générés *in vitro* montrent que les neutrophiles, via la sécrétion de NETs, protègent les cellules tumorales de la chimiothérapie. Les NETs sont des filaments d'ADN recouverts de protéines visant à piéger et tuer de nombreux micro-organismes. Nous montrons qu'après un traitement chimio-thérapeutique, les cellules tumorales secrètent des facteurs qui entraînent la formation de NETs. Ces NETs protègent alors les cellules tumorales du traitement chimio-thérapeutique. En effet, nos résultats montrent que la digestion des NETs avec de la DNase I *in vitro* améliore les effets de la chimiothérapie.

Nous proposons maintenant d'étudier la relevance de nos résultats *in vivo*. Le but de ce projet est d'identifier le rôle des NETs dans la résistance aux traitements chimio-thérapeutiques. Pour ce faire, nous utiliserons des cellules murines métastatiques issues d'un cancer du sein. Ces cellules seront utilisées dans deux modèles tumoraux 1) un modèle de tumeur primaire via implantation de cellules tumorales murines dans la glande mammaire par injection sous anesthésie générale chez la souris

femelle âgée d'au moins 8 semaines 2) un modèle de métastase pulmonaire via implantation de cellules tumorales murines dans la veine caudale chez la souris femelle âgée d'au moins 8 semaines. La drogue chimio-thérapeutique utilisée sera la cisplatine (4 doses seront testées 5 mg/kg 10 mg/kg 15 mg/kg 20 mg/kg, une fois par semaine pendant trois semaines) et la DNase I (15000U/kg/jours) sera utilisée comme inhibiteur des NETs (Albregues et al, Science, 2018). La cisplatine sera injectée 7 jours après implantation des cellules tumorales et ensuite une fois par semaine. La DNase I sera administrée 7 jours après implantation des cellules tumorales et ensuite quotidiennement pendant trois semaines. La croissance et la mort des cellules tumorales seront contrôlées par imagerie par bioluminescence tous les 3 jours.

Un nombre total de 912 animaux sera utilisé pour répondre à nos questions scientifiques.

Cette étude permettra de mettre en évidence les NETs comme cibles thérapeutiques permettant de contrecarrer la résistance aux traitements chimio-thérapeutiques.

Ce projet est en accord avec la règle des 3R, comme définit ci-dessous.

Réduire Le nombre d'animaux a été choisi pour détecter toute différence significative entre les groupes avec un nombre de souris minimum. Nos résultats générés *in vitro* nous ont permis de générer une analyse statistique prévisionnelle permettant de réduire le nombre d'animaux utilisés dans toutes les procédures proposées.

Remplacement L'utilisation de co-culture cellules tumorales-neutrophiles *in vitro*, utilisées en routine au laboratoire, et envisagées aussi souvent que possible, nous permette de réduire considérablement le nombre d'animaux, dans le respect de la règle des 3R.

Raffinement Les animaux utilisés seront des souris Balb/c femelle âgées de 8 semaines. L'injection des cellules tumorales se fera sous anesthésie. Les signes cliniques attendus des animaux développant des tumeurs et des métastases sont des problèmes de déplacements, des signes de douleurs ou encore des difficultés respiratoires. Leur bien-être animal sera évalué de manière objective grâce à des fiches d'évaluation adaptées à cette procédure. Ces fiches contiennent des points limites qui correspondent à un score maximum qui prend en compte plusieurs paramètres. Ces fiches nous permettront d'évaluer le statut des animaux et ainsi de décider de la poursuite de la procédure. De plus, le développement des tumeurs et des métastases sera suivi par imagerie par bioluminescence, une technique non invasive ne nécessitant pas de prélèvements chez l'animal. Le suivi des animaux utilisés sera réalisé 3 fois par semaine avec palpation et mesure de la taille des tumeurs et/ou imagerie par bioluminescence et sera assuré grâce à une fiche de score qui permettra de surveiller l'état des animaux avec une évaluation objective des points limites. Les souris seront sacrifiées à 28 jours après implantation ou lorsque le point limite est atteint.

14768 Toutes nos cellules comportent à leur surface des glycoprotéines spécifiques, c'est-à-dire des protéines auxquelles est un motif glucidique constitué de sucres simples. Ces motifs glucidiques interviennent dans des mécanismes de reconnaissance et d'interaction cellulaires. Une modification de la glycosylation est observée dans certains types de cellules cancéreuses et participe au processus de cancérisation. Dans ce cadre, il a été démontré que les sucres et leurs dérivés dont les acides sialiques jouent donc un rôle important dans l'évolution du cancer colorectal (CCR) sûrement liée pour partie à une dérégulation des gènes codant des sialyltransférases et des sialidases. Par analyse bioinformatique d'expression de gènes codant des sialyltransférases dans un grand nombre de tumeurs colorectales, il s'avère que le gène ST3GAL2 est surexprimé dans le CCR par rapport aux tissus sains, et avec des différences significatives entre les stades du CCR. Or le gène ST3GAL2 code pour un glycosphingolipide impliqué dans l'invasion et dans le développement de métastases. Une invalidation du gène ST3GAL2 a été réalisée dans les lignées de cancer colorectal HCT-116 (stade I), HT-29 (stade II) et SW-620 (stade IV), afin de voir si ce gène est important le développement du CCR. Des tests *in vitro* révèlent que la sous-expression de ST3GAL2 dans les lignées HCT-116 et HT-29 modifient les capacités proliférative, migratoire et invasive de ces cellules. Ces changements de capacités seront évalués *in vivo* à partir de xénogreffes des lignées traités par des sh-RNA à des souris immunodéprimées (30 souris réparties en 6 groupes correspondant à chaque lignée traitée avec des sh anti-ST3GAL2 (3 groupes) et

traitée avec un sh-contrôle (3 groupes). La finalité du projet est de mettre en lumière l'implication de ST3GAL2 dans les capacités migratoire et invasive (métastases) dans un organisme entier et de voir si son inactivation permet de stopper la progression tumorale.

Le projet nécessite au total 30 souris. Ce projet expérimental répond aux exigences des 3R, à savoir Remplacer les modèles *in vitro* ne permettent pas de modéliser toute la complexité de la migration de cellules cancéreuses dans un organisme entier et les réponses de l'organisme dues à des modifications de glycosylation à la surface des cellules cancéreuses. Les modèles murins de greffe de cellules tumorales humaines sont bien décrits et permettent de mimer le phénomène observé chez l'Homme. Ils permettent également d'apprécier l'agressivité des cellules tumorales en fonction de leur niveau de glycosylation. Réduire le modèle de greffe de cellules tumorales humaines est maîtrisé par l'équipe et le porteur de ce projet, ce qui permet de limiter les étapes de mises au point. De plus, les expériences sont organisées dans un ordre précis, avec des témoins choisis de sorte à limiter la répétition d'expériences. La souris est l'espèce modèle la plus adaptée pour ces études précliniques. Le nombre d'animaux a été évalué afin de garantir une puissance statistique suffisante à l'étude tout en utilisant le moins de souris possible. Raffiner les animaux sont élevés dans des conditions d'hébergement (température et hygrométrie de l'environnement, densité d'animaux, présence systématique d'enrichissement, change régulier de la litière, nourriture et eau ad libitum, surveillance quotidienne de l'état général des animaux) qui respectent leur bien-être. De plus, l'ensemble des procédures sera réalisé de manière à limiter le stress et la souffrance des animaux (greffe sous anesthésie, tapis chauffant pendant la greffe, analgésique et anti-inflammatoire si besoin).

14769 Le stress est un facteur de risque majeur de multiples maladies mentales affectant des millions de personnes et imposant un coût socioéconomique important. Comprendre les mécanismes de susceptibilité au développement de troubles mentaux menant à des déficits sociaux et liés au stress est un défi principal des associations de malades et de santé publique.

Notre hypothèse est que dans un contexte spécifique le stress peut induire la maturation des neurones servant des fonctions immédiates au détriment d'autres systèmes utiles plus tard. Par exemple, le stress néonatal est associé au développement précoce des comportements de peur alors que certains comportements sociaux sont compromis à l'âge adulte. La période néonatale est critique pour le développement des systèmes sensoriels ainsi que des comportements sociaux. Ainsi, le stress néonatal est un facteur de risque pour le développement de troubles psychiatriques du comportement, de l'humeur, d'anxiété et de la personnalité. Certains troubles mentaux semblent se développer avec une aberration handicapante dans des situations sociales (trouble de l'autisme, trouble de l'anxiété social ou phobies sociales). Il est donc possible que le cerveau soit capable de faire la distinction entre un contexte social ou non et que certains troubles soient amplifiés ou spécifiques à un type de contexte, suite à un stress pendant le développement.

Si notre hypothèse est vraie, cela signifierait que des troubles sociaux visibles chez l'adulte puissent être le produit d'une altération du développement, dans des régions du cerveau impliqués dans la régulation des comportements sociaux, en réponse à des changements environnementaux. Elucider les mécanismes neurobiologiques de vulnérabilité au stress et leurs liens avec des déficits sociaux nous semble primordial. Le projet vise à comprendre les mécanismes neuronaux à l'origine de déficits sociaux développés en réponse à un stress développemental. En combinant des approches spécifiques d'un type cellulaire pour exprimer des outils génétiques de manipulation fonctionnel et de traçage de réseau avec un modèle de stress naturaliste chez la souris, notre programme de recherche vise à suivre le développement d'un ensemble de comportements sociaux.

Le stress exploite le système neuro-hypophysaire pour dispenser des hormones telles que les glucocorticoïdes, la vasopressine et l'ocytocine dans tout l'organisme y compris le cerveau. Ces hormones ont des propriétés neuromodulatrices et métaboliques permettant d'ajuster le fonctionnement des réseaux ciblés en fonction des demandes environnementales. Des études cliniques sont actuellement menées chez l'homme pour déterminer l'utilité thérapeutique de l'ocytocine et de vasopressine sur les troubles de l'humeur et des comportements sociaux.

Néanmoins, le mode d'action exacte de ces deux hormones dans le cerveau nous est encore inconnu.

Les expériences présentées ci-après seront conduites sur des souris sauvages et des souris génétiquement modifiées pour manipuler les réseaux de neurones contrôlant les comportements sociaux.

Ce projet est innovant et multidisciplinaire, favorablement évalué par la fondation pour la recherche Médicale pour sa réalisation à partir de 2019 du fait de sa portée fondamentale et préclinique.

La REALISATION du projet concerne un total de 768 souris mâles repartis en 87 groupes d'animaux soumis à 7 procédures selon 7 expériences

1-Implication du système de l'ocytocine sur différents comportements durant le développement

2-Implication du système de la vasopressine sur différents comportements durant le développement

3-Contribution des systèmes ocytocine et vasopressine sur la réponse au stress néonatal et leur influence sur les capacités sociales

4-Exploration du « réseau du cerveau social » et de l'implication de l'ocytocine et la vasopressine sur comportement dans un contexte social

5-Rôle des systèmes ocytocine/ vasopressine adulte sur la réponse au stress néonatal

6-Complémentarité des systèmes ocytocine/vasopressine sur les comportements sociaux du sevrage à l'âge adulte

7-Complémentarité des systèmes ocytocine/vasopressine sur la réponse au stress néonatal et leurs effets sur les comportements sociaux du sevrage à l'âge adulte

Des mesures visant à Réduire, Remplacer et Raffiner les expérimentations seront mises en place

1) Nous adapterons des protocoles expérimentaux afin de nous permettre d'analyser la majorité des animaux utilisés à des fins scientifiques (Voir procédures n°1 et 2) et donc de réduire au mieux le nombre d'expériences à effectuer.

2) Nous combinerons les procédures sur les mêmes souris pour effectuer des analyses multiparamétriques, évitant ainsi d'utiliser plus d'animaux que nécessaire pour la réalisation des objectifs tout en gardant la même puissance statistique.

3) Les points limites de chaque manipulation seront adaptés et suivi afin de raffiner au maximum le bien être des animaux.

Afin de réduire la douleur, la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, les mesures suivantes seront prises Les animaux seront opérés sous anesthésie générale après la chirurgie les animaux seront maintenus en atmosphère humide et chauffée jusqu'au réveil. Si les animaux ont perdu du sang pendant la chirurgie, nous administrerons une solution saline en sous cutané. Les animaux seront ensuite gardés dans des cages transparentes et suivis quotidiennement pour des signes de détresse/infection/souffrance. Un analgésique sera disponible dans l'eau des biberons pour réduire la douleur possible liée à la cicatrisation du site d'injection. Les animaux montrant d'éventuels signes d'infection (écoulement, rougeur ou enflure au niveau de la zone de cicatrisation) seront traités avec des antibiotiques.

Il n'existe pas d'alternative de remplacement de la souris pour analyser et manipuler simultanément les comportements sociaux.

Toutes les expériences que nous pratiquerons sur les souris suivront les recommandations du Circo (Guide de l'évaluation éthique) et de la charte pour l'éthique de l'expérimentation animale.

14770 Le but de notre équipe est de créer et/ou de caractériser des modèles animaux de maladies musculaires humaines (myopathies) et de tester l'éventuelle amélioration du phénotype grâce à différentes approches de thérapie génique. Notre travail est principalement axé sur les maladies génétiques affectant les muscles, ces pathologies impliquent notamment une perte de la force musculaire et potentiellement une paralysie progressive des membres. Pour comprendre comment les mutations génétiques sont responsables de ces pathologies, nous avons dans un premier temps utilisé des modèles cellulaires. Nous planifions maintenant d'utiliser des souris pour comprendre à

la fois la physiologie et la pathophysiologie dans un organisme vivant. Dans le but de mieux comprendre les fonctions des protéines impliquées dans ces pathologies et leurs interactions, nous prévoyons d'utiliser 4 modèles murins pour les myopathies congénitales et 1 lignée de souris saines. Les modifications génétiques chez les souris nous permettent d'étudier les pathologies humaines, et de mieux comprendre leur développement. Nous appliquerons nos approches de thérapies géniques et analyserons les souris sur leurs capacités physiques et leurs force musculaire via différents tests d'aptitudes pour mesurer l'amélioration des symptômes myopathiques tels que l'endurance, la force brute, la coordination etc Des études cellulaires ont été effectuées au préalable afin de réduire au maximum le nombre d'animaux. En revanche, seul un organisme entier permet d'étudier d'une part la physiopathologie et d'autre part l'amélioration des symptômes en testant des thérapies. Le modèle animal choisi est la souris car nous avons généré des animaux portant les mutations responsables des myopathies (REPLACEMENT). Plusieurs procédures expérimentales (maximum une/jour) seront réalisées chez les mêmes souris, pour réduire le nombre total de souris. Le traitement sera injecté par voie intramusculaire dans un muscle de la patte de la souris. Une seule patte sera injectée, l'autre patte servira de contrôle. Ainsi chaque animal sera son propre contrôle et cela permet de réduire le nombre d'animaux (REDUCTION). Les souris seront surveillées quotidiennement. Tout signe de douleur sera pris en charge en prenant les mesures appropriées en fonction du niveau de douleur observé, soit un analgésique sera administré, soit les animaux seront retirés de l'étude, prématurément si nécessaire. Le suivi de nos souris inclut une observation du comportement général (perte de poids, apathie, yeux fermés) et de la paralysie des membres postérieurs. Pour les souris qui ont des difficultés pour manger de la nourriture solide (croquettes), de la nourriture en gel sera déposée dans la litière de la cage. Les procédures expérimentales seront faites sous anesthésie générale pour éviter tout inconfort ou douleur pouvant en découler. Les souris seront placées sur une plaque chauffante à 37C pour éviter une hypothermie et de l'ocrygel sera appliqué pour prévenir tout dessèchement oculaire (RAFFINEMENT).

Nous réaliserons dans un premier temps une pré-étude pour déterminer la meilleure voie d'injection et le meilleur vecteur pour obtenir la meilleure diffusion du traitement.

Nous utiliserons ces résultats pour les deux types de cohortes prévues pour ce projet

- Les cohortes de type A seront injectées systématiquement avec le vecteur. Les souris passeront par des tests phénotypiques musculaires pour évaluer l'efficacité du traitement, puis la force musculaire sera analysée directement au sein du muscle.

- Les cohortes de type B seront injectées intramusculairement dans le muscle Tibialis Anterior où l'expression du vecteur sera confinée. Les deux pattes seront injectées soit avec le traitement soit avec le contrôle puis la force musculaire sera analysée directement au sein du muscle.

Un maximum de 2250 souris seront utilisées.

14771 Ces travaux pratiques (TP) de physiologie proposent aux étudiants une étude de physiologie intégrée en utilisant un modèle animal le rat. L'objectif de ce TP est d'étudier quelques paramètres rénaux sur le rat hyperglycémique et en diurèse afin de familiariser les étudiants d'une part à l'expérimentation animale et d'autre part aux techniques chirurgicales de base à travers la mesure de certains paramètres rénaux. A travers ce TP, les étudiants pourront acquérir des bases sur l'expérimentation animale, se sensibiliser à l'acquisition de données *in vivo* qui doit être faite dans les règles et avec soin, ceci étant le prérequis essentiel à l'obtention d'échantillons de qualité et exploitables. De plus, ce TP est parfois leur premier contact avec un animal de laboratoire et leur permet ainsi de réaliser des expérimentations sur un animal vivant.

Un des rôles principaux du rein est de filtrer le sang et d'éliminer les déchets du métabolisme cellulaire sous forme d'urine. C'est ce rôle du rein qui est étudié dans ce TP. Les étudiants travailleront en binôme, avec 2 séances de TP par an prévues. Ceci correspond donc à 20 rats utilisés par an, soit 100 rats au total.

Ce TP utilisera donc le minimum nécessaire de rats en respectant le bien-être animal et la règle des 3R (Réduire Raffiner Remplacer).

- Réduire : nous limitons au maximum le nombre d'animaux par le travail en binôme (1 rat pour 2 étudiants) et favorisons la mise en commun des résultats de la salle afin d'obtenir des résultats exploitables sans toutefois augmenter le nombre d'animaux.
- Raffiner : Les rats utilisés pour ce TP sont soumis à des conditions d'hébergement conformes à la réglementation. Les procédures sont réalisées sous anesthésie générale et la prise en charge de la douleur est prévue avant, pendant et après l'opération de l'animal.
- Remplacer : Ce TP s'inscrit dans la formation d'étudiants qui sont inscrits dans un cursus où la physiologie animale tient une part importante. Il ne peut donc pas être remplacé par une approche cellulaire car il n'est pas possible aujourd'hui de recréer *in vitro* la complexité d'un organisme entier avec la régulation des grandes fonctions telle que la fonction rénale.

14772 Le diabète se caractérise par une élévation prolongée de la glycémie dans le sang (supérieure à 1,26 g/L après un jeûne de 8h, définie par l'OMS). Le diabète de type 1 touche 10 % des personnes diabétiques et se caractérise par une production nulle en insuline, hormone régulatrice de la glycémie sécrétée par les cellules bêta du pancréas (ou îlots de Langerhans). Mal équilibrée, une hyperglycémie chronique conduit à d'importantes complications d'ordre cardiovasculaire, rénal, visuel ou neurologique. C'est pourquoi il s'avère nécessaire d'équilibrer la glycémie des patients diabétiques.

Actuellement, l'insulinothérapie est le traitement de référence en matière de diabète de type 1. Cependant, il s'agit d'un traitement lourd et qui perd de son efficacité chez certains patients diabétiques depuis plusieurs années ou chez les personnes atteintes d'une forme extrême de la maladie. C'est pourquoi de nouvelles thérapies sont envisagées comme la greffe d'îlots de Langerhans, déjà pratiquée chez l'Homme. Il s'agit cependant d'une thérapie nécessitant un traitement immunosuppresseur lourd et une surveillance stricte afin d'éviter le rejet de greffe. Par ailleurs, cette technique de transplantation d'îlots perd en efficacité sur le long terme car certains facteurs s'opposent à sa réussite et réduisent la fonctionnalité des îlots transplantés.

La recherche scientifique s'emploie donc au développement de nouvelles stratégies afin d'améliorer la thérapie par greffe d'îlots, en particulier sur les aspects de rejet de greffe et de diminution de la fonctionnalité des cellules bêta sur le long terme. Des dispositifs d'encapsulation d'îlots de Langerhans ont déjà été mis au point lors de précédentes études précliniques. Il s'agit d'enfermer les cellules bêta dans une capsule en gélatine et alginate (extrait d'algues marines). Cette matière est non seulement perméable au passage des nutriments (oxygène, acides aminés, glucose) et à l'insuline mais constitue aussi une barrière efficace pour empêcher le passage des anticorps et des cellules immunitaires.

Dans la littérature, de nombreuses études concernant ces dispositifs ont déjà été réalisées sur plusieurs espèces animales (Rat, Chien, Primates). Toutefois on note encore certaines limites à cette technique, notamment un manque de biocompatibilité des dispositifs responsable d'inflammation chronique et de fibrose locale ainsi qu'une immunoprotection incomplète des îlots de Langerhans. La poursuite des essais précliniques est donc indispensable pour améliorer les dispositifs d'encapsulation. Le développement d'un nouveau dispositif qui aurait démontré lors de précédentes études sa bonne biocompatibilité ainsi que ses capacités anti-oxydantes sur les cellules bêta est en cours d'étude.

L'objectif de cette étude serait donc d'évaluer la biocompatibilité de ce nouveau matériel d'encapsulation ainsi que son effet sur la survie et la fonctionnalité de cellules bêta autogreffées au sein de dispositifs médicaux d'encapsulation. Pour cette étude, nous travaillerons sur modèle porcin, modèle à haute valeur translationnelle et dont la grande taille permet une facilité de mise en place chirurgicale des dispositifs.

Une première étape aura pour but d'évaluer sur 16 porcs la biocompatibilité du matériel d'encapsulation au sein de l'organisme sans cellules autogreffées sur plusieurs sites d'insertion. L'inflammation et la qualité de la vascularisation seront évaluées par des marqueurs histologiques et de biologie moléculaire. Une seconde étape aura pour objectif d'évaluer sur 8 autres porcs la survie et la fonctionnalité des cellules bêta encapsulées. Les miniporcs utilisés pour cette étape

feront l'objet d'une pancréatectomie. Après isolement des îlots, les cellules bêta seront ensuite greffées au sein des dispositifs au niveau des sites d'insertion préalablement déterminés lors de la première étape. La survie des cellules bêta sera déterminée par des techniques histologiques et de biologie moléculaire, la fonctionnalité *in vitro* par périfusion et la fonctionnalité *in vivo* par des tests métaboliques (repas test et test de tolérance intraveineuse au glucose).

Les porcs utilisés dans cette étude seront hébergés individuellement dans une animalerie adaptée. Nous estimons le nombre de porcs nécessaires à 24 individus. Cependant, nous prévoyons un nombre total de 32 animaux pour cette étude en cas d'échec. Nous ferons en sorte d'utiliser un nombre minimum d'animaux ("Réduire"). Travailler sur modèle de grand Mammifère implique en effet l'utilisation d'un nombre restreint d'animaux utilisés, car proche de l'Homme et à haute valeur translationnelle. Nous optimiserons leur nombre ("Raffiner") en réalisant un maximum de tests et de prélèvements tissulaires par individu. Nous serons de plus particulièrement attentifs à leur développement et à leur rétablissement en utilisant des traitements analgésiques avant, pendant et après toute chirurgie. Cependant nous ne pouvons pas "Remplacer" leur utilisation car nous étudions des mécanismes physiologiques. Les résultats obtenus permettront une éventuelle validation du nouveau dispositif d'encapsulation d'îlots de Langerhans dans le cadre du développement de nouvelles thérapies contre les formes extrêmes de diabète de type 1.

14773 En 2012, en France, 40 000 nouveaux cas de cancers broncho-pulmonaires ont été recensés, et avec une survie à cinq ans n'atteignant pas les 15%, le cancer du poumon est un réel enjeu de santé publique.

On distingue deux grands types de cancers broncho-pulmonaires, ceux à petites cellules (SCLC) et ceux non à petites cellules (NSCLC, non-small cell lung carcinoma) les plus fréquents avec environ 80% des cas.

Dans le cas des NSCLC, la recherche d'évènements moléculaires susceptibles d'être de nouveaux marqueurs pronostiques ou de nouvelles cibles thérapeutiques a mis en lumière que dans plus de 20% des cas, des mutations du gène STK11, codant pour la serine/thréonine kinase LKB1 (Liver Kinase B1), étaient trouvées associées à l'expression d'une forme oncogénique de KRas. Les mutations du gène STK11 identifiées ont pour conséquences la perte fonctionnelle de LKB1 par perte d'expression ou d'activité ce qui a conduit à classer cette kinase comme suppresseur de tumeurs. Cependant, les mécanismes en aval responsables de cette fonction restent incompris.

Le principal objectif de ce projet est de définir les mécanismes moléculaires impliqués dans les propriétés suppresseurs de tumeurs de la kinase LKB1 dans le contexte de tumeurs pulmonaires. Dans ce but, nous cherchons d'une part à définir parmi les protéines STRAD, partenaires nécessaires à l'activité de LKB1, si l'un des deux paralogues (alpha et beta) a un rôle prépondérant et d'autre part si le rôle de LKB1 dans la perception des forces mécaniques, auxquels les cellules sont soumises, est impliqué.

Au cours de recherches exploratoires, l'analyse de données publiques corrélant survie des patients à l'expression des STRAD suggère que contrairement à STRADa, une faible expression de STRADb est de mauvais pronostic. Des approches *in vitro*, utilisant des lignées cellulaires étayent ces données avec une prolifération cellulaire accrue en l'absence de STRADb. Ces résultats expérimentaux *in silico* et *in vitro* concourent à définir que l'activité suppresseur de tumeur de LKB1 est liée à son interaction avec STRADb.

De manière analogue, des approches *in vitro*, où les des lignées cellulaires ont été cultivées sur des supports de rigidités variables ont permis d'identifier un rôle de LKB1 dans divers signaux cellulaires participant à la prolifération et à la dissémination. L'importance des contraintes mécaniques auquel le tissu pulmonaire est assujéti, au travers des déformations (dilatations, étirements) liées à la respiration, suggère que l'activité suppresseur de tumeur de LKB1 puisse être associée à la signalisation mécano-induit.

Que cela soit pour la contribution des STRAD ou l'impact de la signalisation mécano-induite dépendent de LKB1, une approche *in vivo* est nécessaire. En effet, la prise en compte de l'environnement tumoral incluant la complexité tissulaire des tumeurs - telles que leur innervation,

vascularisation - ainsi que le contexte immunologique d'un organisme, est essentiel pour caractériser au mieux les fonctions d'une protéine dans le processus oncogénique.

C'est pour ces raisons que nous proposons l'inactivation des protéines STRAD dans un contexte d'expression de la forme oncogénique de KRas et de définir les conséquences d'une rigidité accrue du tissu pulmonaire induite par une fibrose. Le modèle murin est parfaitement adapté, puisque la perte d'expression de LKB1 récapitule la pathologie humaine et que l'induction et les conséquences de fibroses pulmonaires, notamment sur l'accroissement de la rigidité tissulaire induite, y sont également bien caractérisées.

Définir au travers de quels STRAD LKB1 exerce son activité suppresseur de tumeur et si cela est lié à sa fonction dans la perception des forces mécaniques, auraient des répercussions sur un plan diagnostique. En effet, l'implication de la perte fonctionnelle de LKB1 dans les NSCLC est vraisemblablement sous-estimée, puisqu'aux 20% des cas où la perte de LKB1 est identifiée s'ajouteraient ceux où ce ne serait pas LKB1 mais la protéine STRAD qui serait perdue ainsi que ceux affectant l'élasticité du tissu pulmonaire. D'autre part cela aiguillerait et faciliterait l'identification des voies de signalisation et les mécanismes moléculaires mis en jeu permettant la caractérisation de potentielles nouvelles cibles thérapeutiques. Dans le cas où des traitements les ciblant seraient déjà existants cela pourrait avoir des conséquences sur la prise en charge des patients ou dans le cas contraire participerait à l'élaboration de nouveaux traitements.

Les modèles murins invalidant les STRAD tout en induisant l'expression de la forme oncogénique de KRas sont disponibles. L'hébergement de ces souris s'effectue en confinement adapté au standard SOPF, dans des cages individuellement ventilées (19.68x37.46x13.33cm) à raison de 6 individus maximum de poids moyen de 35g pour les mâles et de 25g pour les femelles. La nourriture et l'eau de boisson sont fournies ad libitum. Les souris de ce projet seront hébergées en groupe (enrichissement social) et un enrichissement complémentaire consistera dans l'ajout de « copeaux compressés » (Nidification). En plus d'une observation quotidienne, la progression tumorale induite de chaque individu sera évalué deux fois par semaine au travers de l'évolution de leurs poids et de leurs fonctions pulmonaires (saturation du sang en oxygène) utilisé comme critères objectifs pour définir les points limites d'une grille de score. Cette dernière définit également les critères relatifs à d'éventuelles signes de souffrances et les moyens de les soulager par l'usage d'analgésiques adéquats.

Nous utiliserons des méthodes alternatives pour satisfaire aux exigences de remplacement, de réduction et de raffinement, ainsi des essais *in vitro* (Chambre de Boyden, cultures tridimensionnelles de type organoïdes.) seront effectués afin de tester les propriétés invasives des cellules.

Le nombre minimum mais néanmoins nécessaire de souris a été calculé afin de d'obtenir des résultats statistiquement significatifs qui à terme identifiera la STRAD responsable des propriétés suppresseur de tumeurs de la kinase LKB1 dans le contexte de tumeurs pulmonaires ainsi que l'éventuelle contribution de la signalisation mécano-induite.

Ce projet utilisera 1080 souris sur une durée de 4 ans.

14774 Contexte scientifique médical et social

Le complexe de Carney (CNC) est une maladie génétique rare, touchant toutes les cellules de l'organisme dès la vie embryonnaire, qui prédispose au développement de très nombreuses tumeurs bénignes dont des tumeurs endocrines multiples responsables d'hypersécrétions hormonales ayant pour origine, entre autres, la glande corticosurrénale et les gonades (glandes stéroïdogènes). De ce fait, les patients souffrant de CNC présentent un syndrome de Cushing (excès de glucocorticoïdes), parfois associé à un hyperandrogénisme (excès d'androgènes) pouvant conduire selon le sexe à une puberté précoce ou à un syndrome polykystique de l'ovaire. Le gène retrouvé majoritairement muté chez ces familles conduit à une augmentation de l'activité de la PKA (protéine kinase A), qui est une signalisation cellulaire très conservée et indispensable à tous les êtres vivants. Précédemment, un modèle de souris reproduisant l'inactivation de ce gène dans la glande corticosurrénale à partir de la naissance, a montré qu'il était responsable de

l'induction des tumeurs surrenaliennes et du syndrome de Cushing chez les patients. En effet, ces souris présentent à l'âge adulte un excès de glucocorticoïdes responsable d'altération des métabolismes glucido-lipidiques et protéiques conduisant à une obésité centrale, une insulino-résistance partielle, une fonte musculaire et une alopecie. L'ensemble de ces signes constitue les comorbidités associées à la surproduction des glucocorticoïdes.

Description des objectifs et du projet bénéfiques/dommages

Notre objectif ici est de reproduire l'atteinte complète des glandes stéroïdogènes telle qu'elle survient chez les patients en ciblant la mutation du gène, à la fois dans la corticosurrénale et les gonades dès la vie embryonnaire. Ceci afin d'explorer les conséquences d'une augmentation de l'activité PKA sur les mécanismes de formation de ces organes, d'étudier la mise en place au cours du temps des syndromes d'hypersécrétion hormonale et de leurs comorbidités et enfin, d'explorer des pistes thérapeutiques (antagonistes GR ou AR) pour combattre certaines comorbidités.

1) Dans ce but, nous allons développer par de simples croisements, des souris génétiquement modifiées déficientes pour le gène, dans ces différentes glandes et à différents stades de développement.

2) Nous rechercherons les conséquences de ces mutations contrôlées dans le temps et les compartiments endocrines, sur l'organogenèse embryonnaire et postnatale de la surrenale et des gonades par des approches immunohistologiques et moléculaires.

3) Nous pratiquerons des explorations fonctionnelles de l'activité endocrine et métabolique, et des conséquences des hyperactivités endocrines sur la qualité osseuse et la structure cérébrale.

4) Nous rechercherons dans ce contexte mutant, les interactions génétiques entre la signalisation PKA et d'autres signalisations importantes pour l'organogénèse endocrine (comme la voie WNT).

5) Enfin, nous testerons les effets d'antagonistes des récepteurs des glucocorticoïdes ou des androgènes sur la survenue des comorbidités métaboliques et osseuses du Cushing et sur les altérations gonadiques attendues de l'hyperandrogénisme.

Règle des 3R

Le rôle pathologique de la mutation surrenalienne du gène dans le déclenchement du syndrome de Cushing (excès de glucocorticoïdes) de l'adulte a été bien établi grâce aux modèles animaux précédemment développés. Cependant, les patients présentant cette mutation (complexe de Carney) développent des atteintes endocrines multiples qui coexistent avec celle de la surrenale, parmi lesquelles on trouve des néoplasies bénignes des gonades parfois associées dans les deux sexes, à un excès d'androgènes. La variété des populations cellulaires potentiellement incriminées dans ces atteintes, requiert une approche *in vivo* pour en étudier la genèse, un suivi postnatal des comorbidités dues aux excès hormonaux (glucocorticoïdes et androgènes) et enfin des approches précliniques pour tenter de les combattre. Par conséquent ces études doivent être réalisées chez la souris (modèle de choix pour les modifications génétiques) car aucune solution alternative n'est à même de reconstituer cette complexité tissulaire et le développement.

Le nombre maximal d'animaux utilisés pour ce projet est d'environ 1500 (6000 doivent être produites par croisements pour obtenir les 1500 souris transgéniques de génotype adéquate). Ces chiffres sont à mettre en perspective de la durée de l'étude (5 ans) soit environ 300/an, du nombre de croisements nécessaires pour obtenir les différentes lignées transgéniques (8 génotypes mutants), et au fait que toutes les études devront être menées à différents stades de développement et dans les deux sexes puisque non seulement les gonades sont concernées mais qu'il existe de surcroît une prévalence féminine, encore inconnue, des manifestations surrenaliennes.

Les avancées attendues sont la compréhension d'une pathologie génétique rare (600 familles suivies dans le monde) grâce à l'obtention de modèles animaux et leur utilisation pour des tests précliniques. Aucune chirurgie n'est nécessaire à ce projet, les procédures restent peu invasives (classes légères à modérées), se limitent à des biopsies de génotypage, des injections intrapéritonéales ou sous-cutanées dont certaines seront pratiquées sur les mêmes lots d'animaux pour réduire leur nombre. Enfin, les études embryonnaires ne seront réalisées que si les

explorations postnatales ne suffisent pas à interpréter les résultats. Aucune douleur n'est attendue suite aux modifications génétiques prévues dans cette étude. Toutefois, les animaux seront observés quotidiennement afin de suivre leur état général (perte de poids, comportements anormaux). Une grille de score permettra d'évaluer de façon objective l'état général des animaux et de les exclure de l'étude si besoin. Les animaux seront élevés dans un milieu enrichi (tunnel de carton, copeaux permettant de nicher, compartimentalisation de la cage).

14775 Le système immunitaire joue un rôle très important dans la défense contre certains pathogènes et dans le développement des maladies inflammatoires et auto-immunes. Les lymphocytes T sont particulièrement importants dans l'orchestration des réponses immunes et il est donc crucial de comprendre les mécanismes qui régulent l'activation et la différenciation de ces cellules. Les cellules T circulent rapidement à travers les organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions lymphatiques) à la recherche d'un pathogène. Quand elles le rencontrent, elles s'activent et se différencient en une sous-population spécifique afin d'orchestrer une réponse immune adaptée. Plusieurs études précédentes et nos expériences *in vitro* ont permis de démontrer que la protéine que nous étudions est essentielle à l'activation des cellules T. Cependant, d'autres mécanismes peuvent être contrôlés par notre protéine.

L'objectif de nos recherches est donc de comprendre comment la protéine que nous étudions peut influencer l'activation et la différenciation des cellules T. Nous devons donc isoler ces cellules T de souris ne possédant plus notre protéine d'intérêt afin de les cultiver *in vitro* selon des conditions bien définies et d'étudier leur activation et leur différenciation en sous-populations effectrices.

Pour cette étude, nous utiliserons deux modèles murins de souris C57BL/6J ne possédant plus notre protéine d'intérêt

- Le 1er modèle présente une délétion de notre protéine spécifiquement dans les lymphocytes T, ce qui permet d'étudier le rôle de notre facteur seulement dans ces cellules sans affecter d'autres populations au sein de l'animal.

- Le 2ème modèle présente une délétion de notre protéine après injection d'un produit permettant ainsi de contrôler la délétion de notre gène dans un cadre spatio-temporel.

Pour réaliser ce projet, 1560 souris au total seront nécessaires et nous avons réparti les expériences en 2 procédures expérimentales détaillées. Nous serons extrêmement attentifs à ce que notre démarche expérimentale soit en conformité avec les exigences de (1) remplacement, (2) réduction et (3) raffinement.

(1) Remplacement Les souris constituent un modèle de choix de par le fait qu'elles peuvent être modifiées génétiquement afin d'éliminer la protéine d'intérêt dans un type spécifique de cellules, comme les cellules T ici, et d'étudier leur rôle *in vivo*. Elles permettent l'étude de mécanismes moléculaires sous-jacents au développement de pathologies dans un environnement complexe, multi-factoriel et très proche de l'homme. Dans l'état actuel de notre projet, elles ne peuvent pas être remplacées par un animal plus petit ou des expériences *in vitro* que nous avons déjà réalisées.

(2) Réduction Les différents protocoles expérimentaux ont été consciencieusement réfléchis afin d'utiliser le moins d'animaux possibles, tout en permettant l'obtention de résultats statistiquement satisfaisants.

(3) Raffinement Nous veillerons consciencieusement au bien-être des animaux grâce à un suivi quotidien en s'assurant de ne jamais atteindre un point limite et en utilisant les animaux bien avant apparition d'un potentiel phénotype dommageable. Dans le 2ème modèle, le site d'injection sera surveillé quotidiennement afin de s'assurer qu'aucun problème n'apparaît en conséquence du geste.

A terme, les résultats de ce projet permettront de comprendre plus précisément les mécanismes qui contrôlent l'activation et la différenciation des cellules T naïves en cellules T effectrices. Cela permettra d'établir de nouvelles bases moléculaires dans l'élaboration de stratégies thérapeutiques dans le traitement des maladies auto-immunes et inflammatoires.

14776 Le foie est un organe majeur dans la régulation du métabolisme. Chez l'Homme comme chez la souris, il stocke des nutriments sous diverses formes, et joue un rôle de tampon dans le métabolisme énergétique. L'intestin est tout aussi essentiel dans le métabolisme énergétique, car il permet l'absorption de nutriments à partir de l'alimentation. Aujourd'hui de nombreuses études montrent que le dialogue entre le foie et l'intestin est fortement perturbé dans beaucoup de maladies métaboliques (obésité, diabète de type 2, dyslipidémie, stéatose). Ainsi au cours de cette étude nous nous intéresserons à 3 récepteurs, impliqués dans le métabolisme énergétique. Dans un premier temps nous voulons caractériser leurs rôles dans le foie, dans l'intestin et dans le dialogue intestin-foie, en condition physiologique. Dans un second temps nous nous intéresserons au rôle de ces récepteurs dans le dialogue entéro-hépatique en condition physiopathologique et notamment dans un contexte de stéatose. La stéatose est caractérisée par une accumulation de graisse au niveau du foie, ce qui perturbe son fonctionnement. Ainsi cette pathologie est de plus en plus répandue, dans le contexte d'épidémie d'obésité mondiale actuelle.

Des études chez des patients atteints de stéatose montrent que le dialogue entre l'intestin et le foie est perturbé. Donc dans la deuxième partie de cette étude nous voudrions approfondir les connaissances concernant le rôle de ces récepteurs dans le dialogue entre l'intestin et le foie, dans la stéatose. Les institutions internationales recommandent de prendre en compte l'effet du sexe dans le métabolisme énergétique puisqu'il existe chez l'Homme de grandes différences biologiques entre hommes et femmes. Nous étudierons donc le rôle de ces récepteurs dans le dialogue entre l'intestin et le foie dans les 2 sexes. Nous utiliserons des souris transgéniques provenant de la souche C57bl6/j, qui est actuellement la plus utilisée au monde pour la recherche en médecine humaine. La proximité génétique de ces souris nous permettra de réduire au plus le nombre d'individus par groupe. De plus les délétions génétiques portées par les souris n'entraînent pas de souffrance, ni de modification du comportement. L'utilisation de modèles *in vitro* n'est pas envisageable, car il est nécessaire d'avoir modèle animal intégré pour étudier le dialogue inter-organe. Nous utiliserons au total 7680 animaux pour ce projet sur une durée de cinq ans.

Des points limites seront définis afin de mettre fin aux procédures pour des animaux qui exprimeraient des signes particuliers ou non attendus. Afin de limiter la souffrance animale au cours de ces études, nous appliquerons les mesures de raffinement suivantes application de crème anesthésiante à usage local pour les prélèvements sanguins, tapis chauffant lors des anesthésies générales, habituation des animaux à l'expérimentateur. Si malgré tous les mécanismes mis en place pour le bien-être animal, nous observons qu'un individu est en souffrance nous l'excluons immédiatement de la procédure en cours.

14777 La sclérose en plaques est une maladie inflammatoire du système nerveux centrale caractérisée par la destruction de la gaine de myéline qui entoure les fibres nerveuses. La myéline est constituée de lipides et protéines et son rôle est d'isoler et de protéger les fibres nerveuses, ainsi que d'augmenter la vitesse de la propagation de l'influx nerveux. La démyélinisation ou perte de la gaine de myéline conduit à la mort des neurones. A l'heure actuelle aucun traitement ne guérit la sclérose en plaques et les traitements existants ont des effets secondaires graves comme le dysfonctionnement cardiaque.

La voie de signalisation cellulaire qui culmine dans l'activation de l'actomyosine participe à de nombreuses fonctions cellulaires dont la myélinisation. De nouveaux inhibiteurs chimiques moins toxiques ainsi qu'un outil génétique sont maintenant disponibles pour l'inhibition de cette voie et nous avons montré que leur utilisation augmente la myélinisation et la survie des neurones dans un modèle cellulaire. Le cerveau est un organe très complexe et impossible à remplacer dans sa globalité par la culture cellulaire. Donc, ce projet vise à déterminer si l'inhibition de cette voie cellulaire augmente la myélinisation et la remyélinisation après une lésion dans un modèle animal à l'instar du modèle cellulaire. Nous avons choisi le rat car c'est un modèle d'étude bien connu et la démyélinisation peut être induite localement sans manifestations cliniques. De plus, la démyélinisation est suivie par une remyélinisation très rapide, permettant l'évaluation de l'effet bénéfique potentiel de l'inhibition de l'actomyosine en moins d'un mois.

Ce projet nécessitera un nombre total maximal de 264 rats de la souche Sprague Dawley pour une durée de 4 ans. Pour réduire le nombre d'animaux, nous avons estimé la taille des échantillons permettant une analyse statistique efficace des résultats à partir de données obtenues dans la littérature.

Ce projet fait appel à des procédures chirurgicales qui se feront à l'aide d'appareils de stéréotaxie sous anesthésie générale et analgésie et des injections intracérébroventriculaires qui se feront sur l'animal entraîné. Une nouvelle technique d'imagerie cérébrale par ultrasons sera utilisée pour suivre la remyélinisation sur l'animal anesthésié. Un grand soin sera porté au suivi régulier du bien-être des rongeurs grâce à une grille précise d'évaluation des points limites. Tout signe de douleur, souffrance, angoisse ou stress chez les animaux sera soulagé avec des analgésiques.

Les résultats de ce projet de recherche fondamentale pourront, à terme, conduire à découvrir une nouvelle cible thérapeutique pour les maladies démyélinisantes.

14778 Actuellement dans le monde, on compte 60 millions de patients épileptiques, principalement des enfants, des adolescents et des personnes âgées.

L'épilepsie est une pathologie neurologique qui se caractérise par un dysfonctionnement transitoire d'un groupe de neurones.

Nous nous sommes penchés sur l'épilepsie-absence, une des formes de l'épilepsie. L'épilepsie-absence est généralisée (touche les 2 hémisphères cérébraux en même temps) et est non convulsive. Cette forme d'épilepsie concerne principalement les enfants âgés de 3 à 10 ans pouvant ainsi impacter le développement cérébral normal de l'enfant.

Les neurones ont des décharges électriques anormales, régulières, synchronisées et bilatérales, en provenance du cortex cérébral. Les crises sont visibles et peuvent être identifiées à l'aide de l'électroencéphalogramme (EEG).

Cette forme d'épilepsie a une réponse aux antiépileptiques différente de celle observée dans les autres types d'épilepsie en effet, certains antiépileptiques provoquent des aggravations des crises. Il est donc primordial de tester leur efficacité ou leur effet aggravant sur un modèle biologique animal avant d'effectuer des essais cliniques chez l'être humain.

Dans ce projet, un modèle rongeur (*Rattus Norvegicus*), présentant spontanément des décharges épileptiques de type absence, sera utilisé. D'un point de vue pharmacologique, chez ce modèle, les crises sont supprimées par des antiépileptiques comme le valproate, l'éthosuximide ou le lévétiracétam alors que la carbamazépine, le phénytoïne ou le prégabalin ont un effet aggravant sur les crises de type absence. Ce modèle offre donc une vraie opportunité pour identifier les effets des molécules antiépileptiques en développement pour ce type de crise.

Pour ce projet, nous pensons utiliser 60 lots avec pour chaque lot, l'utilisation de 12 rats, soit 720 rats sur 5 ans.

Réduction Ce nombre d'animaux a été déterminé de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en gardant un nombre suffisant pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées. De plus, les animaux sont traités en plan d'étude croisé (tous les animaux reçoivent toutes les molécules avec à chaque fois une vérification de l'EEG avant une nouvelle administration - chaque animal est son propre contrôle). Chaque animal possède deux voies d'enregistrements permettant ainsi de réaliser les enregistrements même si un canal d'enregistrement devient inexploitable.

Raffinement Le projet implique la mise en place d'un système d'enregistrement EEG chez le rongeur avec une chirurgie de classe modérée. Cependant, l'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à une grille codifiant le niveau de douleur. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

Remplacement Ce projet a pour but de mesurer l'efficacité de composés sur des marqueurs pathologiques dans un organisme complet et complexe. De ce fait, il est impossible de remplacer notre préparation *in vivo* par un modèle cellulaire ou une simulation computationnelle.

14779 Ces travaux pratiques (TP) de physiopathologie proposent aux étudiants une étude diagnostique de l'état diabétique en utilisant un modèle animal : le rat. Le diabète sucré se définit par une élévation anormale et chronique de la glycémie (taux de glucose dans le sang). L'hyperglycémie chronique résulte : soit d'un défaut partiel ou complet du pancréas endocrine à synthétiser de l'insuline (= seule Hormone hypoglycémisante), soit d'une inaptitude des cellules à utiliser l'insuline pour absorber le glucose. L'accumulation de glucose dans le sang cause donc une hyperglycémie chronique, qui est commune à tous les diabètes.

L'objectif de ce TP est de mettre en évidence l'état diabétique chez un rat à l'aide de tests diagnostiques. Les étudiants pourront ainsi se familiariser, par le biais de l'expérimentation animale, à l'acquisition de données *in vivo* qui doivent être faites dans les règles et avec soin afin d'obtenir des échantillons de qualité et exploitables pour la pose d'un diagnostic sûr. Les étudiants travailleront en binôme, avec deux séances de TP par an prévues. Ceci correspond à 32 rats (2 par binôme) utilisés par an, soit 160 rats sur 5 ans.

Ce TP utilisera donc le minimum nécessaire de rats en respectant le bien-être animal et la règle des 3R (Réduire-Raffiner-Remplacer).

- Réduire : nous limitons au maximum le nombre d'animaux par le travail en binôme et favorisons la mise en commun des résultats de la salle afin d'obtenir des résultats exploitables sans toutefois augmenter le nombre d'animaux.

- Raffiner : Les rats utilisés pour ce TP sont soumis à des conditions d'hébergement conformes à la réglementation. Les procédures sont réalisées sous anesthésie générale et la prise en charge de la douleur est prévue avant et pendant l'opération de l'animal.

- Remplacer : Ce TP s'inscrit dans la formation d'étudiants en physiologie et ne peut donc pas être remplacé par une approche cellulaire. Dans cette étude à visée pédagogique, il n'existe pas d'autres moyens, que les modèles animaux, pour nous permettre d'analyser les paramètres identifiant un état diabétique. Les rats représentent un bon modèle d'étude pour les pathologies diabétiques, assez proche de celui observé chez l'Homme.

Ce TP s'adresse à des étudiants de niveau Master 1, qui sont inscrits dans un cursus où la physiologie animale tient une part importante. Ce TP leur permet d'approfondir leurs bases, acquises en L3, sur l'expérimentation animale, non plus en étudiant une fonction physiologique, mais plutôt son dérèglement, ici le métabolisme glucidique.

14780 La maîtrise de l'ovulation permet d'augmenter le succès reproductif lors de l'utilisation de l'insémination artificielle chez les animaux de rente. Chez les mammifères, certaines procédures couramment utilisées posent des problèmes d'efficacité et d'acceptabilité. Par exemple, la molécule (PMSG) produite avec des juments gestantes a lourdement fait débat dans les médias au cours de l'année 2019. Le b-NGF et la kisspeptine sont des possibles alternatifs à ces traitements mais leur utilisation telle quelle est trop contraignante et la recherche de molécule de coût de production moindre est essentiel. Nous avons sélectionné deux molécules qui pourraient s'inscrire dans ce cadre. Nous voulons i) vérifier si ces molécules sont capables d'induire l'ovulation, ii) tester si les effets b-NGF passent par l'étage hypothalamique et iii) quel récepteur transfère ses effets. Cette première étude nous permettra par la suite d'envisager le test de nos molécules chez des espèces de rente cible : le mouton et le cheval.

Le protocole proposé s'inscrit dans la règle des 3R

Remplacer Nous avons réalisé au préalable des études *in vitro* qui nous ont permis de déterminer les différentes doses à tester et l'étude du fonctionnement du déclenchement de l'ovulation ne peut se faire que dans un organisme entier.

Réduire : Notre nombre de souris par lots a été basé sur une de nos précédentes expériences qui nous a donnée des résultats tout à fait exploitables statistiquement. Ainsi 28 groupes de 10 animaux sont requis, soit 280 souris, au maximum seront étudiés pour ce protocole. Ce nombre d'animaux a été calculé à l'aide d'outils statistiques permettant un calcul juste du nombre d'animaux à placé dans chaque lot.

Raffiner les souris seront hébergées par quatre et le milieu sera enrichi par la présence d'igloos en carton (boîtes à œufs). Un massage local suivra chaque injection afin de faciliter la diffusion des produits et diminuer la sensation douloureuse. Nous prendrons soin à réaliser alternativement les injections intrapéritonéales à droite et à gauche afin d'éviter la sensibilisation des territoires cutanés concernés. Nous organiserons les injections de façon à stresser le moins possible les animaux en limitant leur sortie de la cage autant que faire se peut.

14781 Le diabète affecte plus de 425 millions de personnes dans le monde et est responsable de 11% de la mortalité mondiale. Le diabète de type 2 (DT2) est de loin le diabète le plus fréquent. Il se caractérise par une hyperglycémie chronique délétère résultant d'une insuffisance de sécrétion d'insuline par les cellules β des îlots pancréatiques. Malgré les progrès pharmacologiques récents, l'objectif thérapeutique du contrôle glycémique est difficile chez de nombreux patients. Mal traité, le diabète engendre des complications graves qui ont un retentissement majeur sur la qualité de vie, la mortalité ainsi que le coût global de la santé. L'amélioration de la prise en charge thérapeutique des diabétiques de type 2 constitue un objectif majeur de santé publique. Certains diabétiques de type 2 sont résistants aux agonistes du récepteur du glucagon-like peptide-1 (GLP-1RA). La β -arrestine 1 est un acteur essentiel de la signalisation du GLP-1R dans la cellule β pancréatique et toute modification de son niveau d'expression pourrait être une explication de la non réponse au traitement.

Notre objectif est de vérifier si le niveau d'expression de la β -arrestine 1 dans les cellules mononucléées sanguines (CMS), accessibles par une simple prise de sang, pourrait permettre de prédire la réponse aux GLP-1RA chez les patients DT2. Nous proposons de réaliser une étude préclinique sur un modèle animal de DT2 avec 2 objectifs 1) Evaluer l'impact de l'évolution du diabète (hyperglycémie) sur l'expression de la β -arrestine 1 dans les CMS et les îlots pancréatiques 2) Etablir une corrélation entre le niveau d'expression de la β -arrestine 1 dans les CMS et dans les îlots pancréatiques. Nous utiliserons un modèle animal d'obésité et de DT2 (souris db/db).

Cette étude sera menée en conformité avec les recommandations de la règle des 3R. Le nombre total de souris nécessaires est de 40 souris (20 db/db et 20 contrôles). Après réception d'un élevage et un transporteur agréés, les animaux sont élevés en zone EOPS dans un environnement enrichi (copeaux, cotons, protections plastique rouge). Plusieurs tissus d'un même animal ainsi que des statistiques robustes sont utilisés. Les souris db/db diabétiques sont obèses et présentent un phénotype domageable (polyphagiques, polydipsiques et polyuriques). Pour optimiser l'expérimentation et réduire les dommages potentiels, les animaux sont stabulés par 2-3. De plus, on vérifie quotidiennement l'accès à une nourriture adéquate et à l'eau et on met une litière abondante et absorbante avec des changements fréquents des cages.

A notre connaissance, il n'existe pas d'études antérieures concernant l'impact du diabète sur l'expression de la β -arrestine 1 dans les CMS. La recherche *in vivo* d'une corrélation entre le niveau d'expression de la β -arrestine 1 dans les CMS et dans les îlots pancréatiques au cours de l'évolution du diabète ne peut être remplacée par des tests *in vitro* ou *in silico*. Les procédures expérimentales sur les animaux n'excéderont pas 2 mois.

Les animaux seront surveillés quotidiennement et en cas de gêne ou souffrance (altération anormale du pelage, une perte de poids, une inactivité prolongée, des signes cliniques comme écoulement nasal ou oculaire, yeux exorbités ou fermés, augmentation de la fréquence respiratoire, dyspnée, convulsions / tremblements) entraîneront l'euthanasie.

14782 La reproduction chez les caprins à lieu à l'automne et en hiver (saison sexuelle). Cette saisonnalité conduit à des variations annuelles dans la disponibilité des produits et du prix du lait sur le marché. La reproduction hors saison sexuelle est une solution pour maintenir l'offre en lait ou fromage tout au long de l'année (enjeu majeur pour la filière caprine).

Différentes techniques sont disponibles pour maîtriser la saisonnalité de la reproduction. Les traitements hormonaux d'induction des chaleurs (comportement d'acceptation de la monte du mâle)

et des ovulations sont les plus efficaces. Or, le contexte réglementaire et sociétal actuel oriente vers une moindre utilisation des hormones en élevage.

Des méthodes alternatives aux hormones existent, notamment « l'effet mâle » qui consiste à stimuler l'activité ovulatoire de chèvres en anœstrus saisonnier (au repos sexuel) par leur exposition à des boucs sexuellement actifs. Toutefois, cette pratique nécessite un nombre important de mâles dont les manipulations sont chronophages et contraignantes pour l'éleveur, ce qui demande de la main d'œuvre et des coûts d'entretien supplémentaires. Ceci représente un frein pour le développement de cette technique en élevage.

Puisque l'effet mâle est dépendant de signaux olfactifs émis par le mâle, il serait possible d'utiliser les molécules olfactives impliquées dans cet effet mâle pour la mise en œuvre « d'un effet mâle sans mâle ».

Récemment, nous avons identifié des molécules olfactives présentes dans la toison, les sécrétions ante-orbitales et l'urine de boucs entiers sexuellement actifs. L'objectif de ce projet est d'évaluer la capacité de ces molécules à stimuler l'activité sexuelle des chèvres en anœstrus saisonnier, puis de définir leur « mode d'emploi » pour une utilisation en élevage. Un total de 75 chèvres de race alpine seront utilisées. Des prélèvements sanguins seront réalisés dans la veine jugulaire (au niveau du cou) des chèvres pour suivre leur réponse hormonale après stimulation par les molécules olfactives du bouc.

Remplacement : La stimulation de l'activité sexuelle de la chèvre par effet bouc est un phénomène naturel mais complexe impliquant plusieurs organes (système olfactif, système nerveux central, hypophyse, ovaires), ne pouvant pas être étudié *in vitro*.

Réduction : Un calcul de puissance statistique a été fait pour réduire au minimum le nombre d'animaux.

Raffinement : Pour les prélèvements sanguins, des précautions seront prises afin d'éviter tout risque de phlébite (tonte au niveau du cou pour mieux visualiser les veines, application d'un baume décongestionnant, antiseptique et cicatrisant).

14783 Le cannabis est la drogue la plus cultivée, produite, vendue illégalement et consommée dans le monde. Aujourd'hui, en France, les débats s'intensifient sur la légalisation du cannabis et ses bienfaits médicaux sont régulièrement avancés bien que l'impact du cannabis sur la santé, et particulièrement la santé reproductive, soit encore mal compris. Récemment, une analyse a corrélé la consommation de cannabis et le développement de cancer du testicule suggérant que ses utilisations récréatives et/ou thérapeutiques représentent un facteur de risque pour le développement de ce type de cancer chez l'homme. La consommation de cannabis a également été associée à une augmentation du taux de testostérone et à une baisse de la concentration spermatique. Les composants principaux du cannabis, dont le Δ -9-tétrahydrocannabinol (THC) et le cannabidiol (CBD), agissent sur des récepteurs cellulaires spécifiques et peuvent ainsi activer une multitude de voies de signalisation intracellulaires. La consommation de cannabis étant liée au développement de cancer testiculaire, dont l'origine est une dérégulation de la différenciation des cellules souches germinales, ainsi qu'à une baisse de la concentration spermatique, cela suggère que l'activation de ces récepteurs, présent au niveau des cellules germinales, par le cannabis ou ses dérivés pourrait affecter leur différenciation/maturation. Néanmoins, force est de constater que les recherches sur l'effet du cannabis utilisé à des fins récréationnelles ou thérapeutiques sur la santé sont encore très limitées. Pour cela, l'objectif de ce projet sera de vérifier l'effet sur la physiologie de la reproduction chez le mâle de deux composants majeurs du cannabis, le THC et le CBD, seul ou en mélange, retrouvés à la fois dans le cannabis mais également dans des médicaments dont les principes actifs sont des extraits de cannabis. Pour répondre à cet objectif, nous traiterons des souris mâles Swiss non-consanguines par voie orale avec du THC et/ou du CBD à la dose de 5 mg/kg/jour. Le projet nécessite l'utilisation de 600 souris et tient compte de la règle des 3R : Remplacement : nous aurons recours à des explants de testicule humain provenant de donneurs d'organes; Réduction : nous travaillerons avec le nombre minimum d'animaux permettant d'avoir des données statistiquement utilisables; Raffinement : les drogues utilisées

seront administrées par gavage par un animalier expérimenté pour ce genre de traitement, nous adapterons la taille de la sonde à l'âge de l'animal et nous vérifierons les points limites en cours de traitement.

14784 La stimulation électrique du cerveau, ou « neurostimulation », représente une approche prometteuse pour réduire la fréquence des crises dans certaines formes d'épilepsie qui ne sont pas soulagées efficacement par les médicaments.

Cependant, les effets de la neurostimulation sur le cerveau restent mal compris. Les paramètres (intensité du courant, nombre d'impulsions électriques par seconde) sont souvent déterminés de manière empirique, sans base scientifique.

Pour aborder cette question, la validation préclinique (chez l'animal) des protocoles de neurostimulation est une étape clé vers une utilisation potentielle chez les patients.

Ce projet vise à étudier *in vivo* les effets thérapeutiques de certains protocoles de neurostimulation dans un modèle expérimental d'épilepsie (souris). Brièvement, une très faible dose de chlorure de fer est injectée dans le cortex de la souris. Elle déclenche le développement de l'épilepsie. Les événements épileptiformes observés dans ce modèle sont particulièrement intéressants. Ils apparaissent souvent (plusieurs par minute) et constituent un excellent marqueur de l'épilepsie. En pratique, des données expérimentales (électroencéphalographiques -EEG-, activité électrique du cerveau) seront collectées dans les conditions « sans stimulation » et « avec stimulation » sur 75 souris (trois groupes).

Les événements épileptiformes seront détectés par analyse du signal EEG. Leur apparition sera quantifiée. Une analyse statistique permettra de valider l'effet thérapeutique de la neurostimulation correspondant à une diminution significative des événements épileptiformes.

Ce type de projet ne peut se passer d'expérimentation animale, néanmoins il vise à limiter au maximum le nombre d'animaux. Le projet respecte en tout point la règle des « 3Rs » (remplacer, réduire, raffiner).

En effet, les protocoles de neurostimulation testés chez l'animal ont été préalablement testés sur des modèles informatiques permettant de simuler, sur ordinateur, le fonctionnement des réseaux neuronaux et l'effet de la neurostimulation sur l'activité épileptique. Nous avons donc remplacé l'animal par l'ordinateur pour optimiser le choix des paramètres. La réduction du nombre d'animaux par utilisation de ces modèles informatiques est aussi accentuée par le choix d'analyses statistiques permettant de réduire les effectifs à 25 animaux par groupe. Enfin, nous avons raffiné les procédures en minimisant la douleur des animaux (anesthésies générale et locale) et en incluant des points d'arrêt.

Les neurostimulations thérapeutiques constituent une alternative majeure aux médicaments dans le cas des épilepsies pharmaco-résistantes. Le projet est centré sur les épilepsies dites « néocorticales ». Le modèle murin (souris) utilisé est pertinent pour les épilepsies partielles néocorticales humaines.

14785 Le projet Le cancer reste l'une des causes de mortalité la plus fréquente dans le monde. Les chimiothérapies « ciblées » et l'immunothérapie ont amélioré ces dernières années le pronostic chez certains patients, mais il reste sévère chez beaucoup d'autres, notamment ceux atteints d'un cancer broncho-pulmonaire évolué. L'un des enjeux majeurs de la cancérologie actuelle est d'améliorer l'efficacité des traitements, tout en faisant que les patients conservent une qualité de vie.

L'une des stratégies prometteuses serait d'agir sur le métabolisme, car les tumeurs se comportent comme des « parasites » qui consomment les réserves des malades (fonte musculaire, disparition des graisses, amaigrissements...) Les cancers sont en effet avides de glucose et des expériences ont montré que leurs cellules s'arrêtent généralement de proliférer lorsqu'on diminue fortement leur consommation de glucose. Cette stratégie rendait également les cellules tumorales plus sensibles aux chimiothérapies comme le cisplatine, l'une des drogues les plus employées en cancérologie. Par ailleurs le « détournement » du glucose par les tumeurs, prive les « bonnes » cellules

inflammatoires anti-tumorales du glucose dont elles ont besoin pour s'activer et détruire les cellules cancéreuses. Nous souhaitons donc confirmer qu'il est possible d'améliorer l'efficacité de la chimiothérapie en diminuant l'apport en glucose au moment de l'administration; puis qu'il est possible d'activer les cellules immunitaires anti-cancéreuses en augmentant les apports en glucose et en calories après la chimiothérapie. Ce régime, a priori sans effet secondaire, a l'avantage d'être de courte durée. Il pourrait améliorer la tolérance à la chimiothérapie (réduction des nausées) et permettre de récupérer ensuite la perte de poids par le régime hypercalorique. Enfin, l'amélioration de la qualité de vie et de l'efficacité de la chimiothérapie se ferait à un coût négligeable.

Pour compléter cette étude d'optimisation de l'action de la chimiothérapie nous allons ajouter un anticorps dirigés contre la forme longue de la neurotensine le Long Fragment de la NeuroTensine (LF-NTS). Il est prouvé que cet anticorps sous sa forme murine diminue la croissance de la tumeur, réduit les processus métastatiques, et améliore la réponse aux chimiothérapies. Des études préliminaires nous ont permis de mettre en évidence une action de cet anticorps sur la prise de poids et l'activité des animaux suggérant que cet anticorps pourrait contrecarrer la cachexie induite par le cancer.

Nous voulons valider que l'effet du LF-NTS, associé à la variation des apports en glucose améliorent la réponse au cisplatine en stoppant la progression tumorale.

Nous souhaitons réaliser ce projet pour valider ce concept chez l'animal avant de le proposer pour des essais cliniques chez l'Homme.

Les animaux

* Type Modèle de souris immunocompétente C57BL/6J.

* Nombre : Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 468 souris expérimentales pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

La conformité au principe des 3R

*Remplacement Un système vivant est nécessaire pour étudier les acteurs mis en jeu dans la variation de l'apport calorique nécessaire dans la mise en œuvre de ce projet. Il n'est pas possible de recréer *in vitro* la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs cellulaires rentrant en jeu.

*Réduction Nous limitons au maximum le nombre d'animaux par groupe de façon à obtenir des résultats statistiquement fiables. A cause des variabilités inter-animales et intergroupes, un nombre trop restreint d'animaux engendrerait des résultats trop variables et non valides. Compte tenu des données de la littérature (variabilité attendue) et des effets espérés, un test de puissance statistique a été utilisé pour déterminer le nombre minimum d'animaux nécessaire pour cette étude.

*Raffinement Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures ont été mise au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal, en limitant la douleur et le stress (anesthésie, analgésie, etc.). Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation, les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum. Le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification ou de maison de type igloo. Nous nous efforçons à chaque instant de raffiner nos procédures afin de garantir le bien-être des animaux en cours de procédure grâce à une surveillance attentive (point limite) et des soins adaptés (anesthésie, analgésie, etc.).

14786 Le glioblastome est la tumeur cérébrale primitive la plus fréquente et la plus maligne. La survie moyenne est d'environ une année. La récurrence tumorale dans ce cancer est un problème majeur de santé public puisqu'il concerne la majorité des patients qui vont être opérés et traités ensuite par chimiothérapie. Identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à sensibiliser les cellules résistantes à la chimiothérapie est un enjeu de la recherche actuelle. Dans ce contexte le but de ce projet de recherche est d'évaluer l'impact d'une protéine (Rad18) sur la prolifération tumorale et la

résistance aux chimiothérapies. Pour mener à bien notre projet, des injections en sous cutanée de cellules tumorales humaines (3 lignées) seront réalisées dans des souris immunodéprimées.

Pour cette étude nous avons prévu un nombre total maximal de 120 souris.

Dans le cadre de la règle des 3R, le nombre d'animaux a été réduit au minimum après calcul de l'échantillonnage nécessaire afin d'obtenir une puissance statistique satisfaisante.

Par ailleurs les souris disposent de copeaux de bois dans leurs cages afin d'améliorer leurs conditions d'hébergement. Une surveillance quotidienne sera faite sur les souris en expérimentation afin de veiller au bien-être des animaux.

Enfin ce modèle préclinique de tumeurs humaines chez la souris immunodéprimée est essentiels pour évaluer l'impact d'une protéine sur le développement tumoral.

14787 La maladie de Rendu-Osler (RO) ou HHT (Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia) est une maladie rare qui se caractérise chez les patients par des épistaxis (saignements du nez) importants, des télangiectasies (dilatations de petits vaisseaux sanguins) au niveau des muqueuses ou sur la peau et des malformations artério-veineuses (jonction directe entre veines et artères) au niveau du foie, des poumons et du cerveau dans les cas les plus graves. Il s'agit d'une maladie génétique rare impliquant plusieurs gènes, dont notamment un gène codant pour le récepteur ALK1, spécifique des cellules endothéliales (cellules qui tapissent la paroi interne des vaisseaux sanguins). ALK1 est une protéine directement impliquée dans l'angiogenèse (formation des néo-vaisseaux à partir de vaisseaux existants), un processus physiologique normal dans le développement du réseau vasculaire mais qui est également impliqué dans un certain nombre de pathologies. Chez les patients atteints de la maladie de Rendu-Osler, la mutation de ce gène, ALK1, suffit à déclencher la maladie.

Notre équipe a identifié la protéine BMP9 (Bone Morphogenetic Protein 9), un facteur de croissance, comme ligand du récepteur ALK1. L'objectif de cette étude vise à déterminer le rôle potentiel de BMP9 sur la vascularisation sanguine et lymphatique et son implication dans la maladie de Rendu-Osler. Pour répondre à cette question, nous utiliserons des souris privées de Bmp9 que nous comparerons à des souris normales. Cette souche murine Bmp9-KO a été choisie en accord avec les connaissances scientifiques car elle présente un phénotype proche de la maladie de Rendu-Osler.

Notre étude vise à identifier des malformations (télangiectasies, malformations artério-veineuses dans les différents organes fréquemment touchés par la pathologie tels que le foie, le cerveau et les poumons) chez ces souris Bmp9-KO s'apparentant à ceux de la pathologie humaine. Ceci permettra de valider ce modèle murin pour l'étude de la pathologie. Il est attendu que ces phénotypes apparaissent et s'intensifient sur les animaux vieillissants comme c'est le cas dans la pathologie humaine.

Aucune méthode cellulaire ou informatique ne peut fournir ces informations, importantes pour l'élaboration ultérieure de stratégies thérapeutiques. Le recours à des investigations *in vivo* est donc nécessaire.

Le modèle rongeur a été choisi pour réaliser cette étude. Les animaux sont nés et élevés dans un établissement agréé à des fins scientifiques. L'étude porte sur 1436 animaux. Ce nombre a été déterminé sur la base de données scientifiques et de nos observations de nos modèles rongeurs pour répondre aux exigences d'un test statistique (test non paramétrique de Mann-Whitney) qui sera appliqué pour chaque paramètre observé. Néanmoins, nous veillerons à n'utiliser que le minimum nécessaire d'animaux pour assurer la validité des résultats.

Les animaux sont hébergés en groupe dans un environnement enrichi. Une surveillance rapprochée des animaux sera réalisée pour détecter au plus tôt les premiers signes de la maladie et sera suivi d'une euthanasie. Des protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis pour éviter les douleurs lors des interventions sur les animaux, ainsi que des critères d'arrêt pour prendre en compte d'éventuels effets inattendus.

14788 Les lymphocytes T CD4 ont pour fonction d'orchestrer les réponses immunes, permettant d'augmenter l'efficacité de ses dernières. Plusieurs types de lymphocytes T CD4 coexistent dans l'organisme

- Les lymphocytes T CD4 dits effecteurs dirigent l'orientation des réponses immunes dans le but d'éradiquer les agents pathogènes.

- Les lymphocytes T CD4 dits régulateurs ont un rôle majeur dans le maintien de la tolérance immunitaire et la prévention des maladies auto-immunes.

Un équilibre finement contrôlé entre le nombre de lymphocytes T régulateurs et effecteurs est nécessaire pour permettre de lutter efficacement contre les bactéries, virus et parasites tout en inhibant les réponses immunes contre les antigènes tissulaires, réponses qui aboutiraient au développement de maladies auto-immunes. Dans nombre de maladies auto-immunes chez l'homme et la souris, il a pu ainsi être mis en évidence une diminution du nombre ou des fonctions des lymphocytes T régulateurs.

Nous souhaitons, dans le cadre de ce projet, analyser le rôle de plusieurs protéines dans le contrôle de la production des lymphocytes T régulateurs et donc de leur nombre. Les lymphocytes T régulateurs sont, en grande partie, produits dans le thymus. Nous procéderons ainsi à la mesure à différents âges de la production thymique de lymphocytes T régulateurs dans des souris déficientes ou proficientes pour l'expression des protéines que nous souhaitons étudier.

En conformité avec les exigences 3R

- Des lots d'un nombre réduit d'animaux seront utilisés en anticipant la validité statistique des données obtenues (Réduction).

- Des points limites appropriés ont été définis et permettront de mettre fin si nécessaire à l'expérimentation de manière anticipée.

- Des mesures visant à réduire au maximum la douleur, la souffrance et l'anxiété des animaux seront prises (Raffinement). Ainsi, l'injection intrathymique de fluorochrome, qui est la seule procédure, sera faite directement sous échographie pour éviter la chirurgie lourde nécessaire sinon à atteindre le thymus et à injecter en son sein. Cette injection se fera sous anesthésie générale et les animaux seront surveillés jusqu'à leur réveil complet.

- Aucune méthode alternative *in vitro* ne permet de mesurer la migration quotidienne des lymphocytes T régulateurs du thymus vers les organes lymphoïdes périphériques (Remplacement).

Le nombre total d'animaux est estimé à 270 souris pour l'ensemble du projet qui se déroulera sur cinq ans. Les résultats obtenus dans le modèle animal devraient apporter une meilleure compréhension des mécanismes de génération de cellules T CD4 régulatrices dans le thymus et conduire également vers de nouvelles stratégies d'immunothérapie et de traitement des maladies auto-immunes.

14789 La sclérodémie systémique (SSc) est une maladie fibrosante et auto-immune rare (12 000 cas en France), parfois mortelle et très invalidante pour laquelle il n'existe pas de traitement curatif actuellement. Les causes de la SSc sont inconnues mais l'inhalation de poussière de pierre appelée silice cristalline, notamment rencontrée en milieu professionnel (tailleur de pierre, BTP), est un facteur de risque reconnu de développer cette pathologie et/ou d'aggraver sa sévérité. Le poumon pourrait constituer le point de départ de maladies auto-immunes systémiques, c'est à dire des pathologies où le système immunitaire s'attaque à l'individu qu'il est supposé protéger. Toutefois les mécanismes impliqués restent à préciser.

Afin de mieux étudier les mécanismes à l'origine de la SSc, des modèles murins ont été développés. Ainsi, un modèle de souris sclérodermiques induit par une injection sous-cutanée d'acide hypochloreux, reproduit à la fois les caractéristiques fibrosantes c'est à dire le durcissement de la peau ou du poumon liée à une accumulation de collagène, et auto-immunes (production d'auto-anticorps) de la pathologie après 4-6 semaines d'exposition.

Le projet a pour objectifs de caractériser les effets pulmonaires, cutanés et sur le système immunitaire d'une exposition à la silice cristalline dans le modèle de souris sclérodermiques

précédemment décrit et, d'étudier le rôle de certaines cellules de l'immunité, les macrophages, dans les effets inflammatoires, fibrosants et auto-immuns. Nous étudierons en particulier la capacité des macrophages à phagocyter des cellules apoptotiques (ou efferocytose) car cette fonction participe à la résolution de l'inflammation mais aussi à la tolérance immunitaire. Sur la base de travaux personnels, nous émettons l'hypothèse qu'un défaut d'efferocytose induit par une exposition à la silice cristalline pourrait aggraver et/ou chroniciser le phénotype sclérodermique. Par ailleurs, nous évaluerons les effets de molécules susceptibles d'augmenter l'efferocytose et donc de limiter la sévérité du phénotype sclérodermique (fibrose et auto-immunité).

Le nombre de souris nécessaires à la réalisation de l'étude est évalué au nombre de 400, nous avons pensé ce protocole en suivant la règle des 3 R « Remplacer, Réduire, Raffiner »

-Nous avons réduit le nombre de souris à celui requis pour obtenir une validation statistique des résultats et nous avons envisagé plusieurs mesures sur les échantillons prélevés au niveau des organes touchés (poumons, peau, sang). Toujours dans l'objectif de limiter le nombre d'animaux, les effets de médicaments améliorant ce "nettoyage des déchets de cellules" seront testés sur deux lots de souris mais au cours d'une même expérience ce qui permettra d'avoir le même lot de souris sans médicament.

-Il faut noter qu'il n'existe aucun moyen de remplacer de telles études qui englobent l'ensemble de l'organisme et que seule, l'expérimentation animale permet un suivi complet du développement de la maladie et permet d'étudier la réponse à des médicaments d'intérêt.

-En terme de raffinement, la procédure a été travaillée pour limiter le stress des animaux (traitement dans une salle de contention dédiée) et pour empêcher la douleur par l'administration de sédatif et d'antidouleur adaptés aux comportements de l'animal. Par ailleurs, les souris seront quotidiennement observées (apparence physique, signes physiologiques et comportementaux) et pesées 2 fois/semaine afin d'évaluer le degré de sévérité de la douleur des procédures appliquées aux animaux, que nous prévoyons faible à modérée.

Au total, ce travail permettra d'une part de préciser les mécanismes responsables de l'autoimmunité dans la sclérodermie systémique et l'impact de la silice cristalline sur l'évolution et sévérité de cette pathologie systémique chez la souris et d'autre part de tester l'effet de médicaments pour cette pathologie rare mais mortelle chez l'homme.

14790 Les infections mammaires des bovins sont fréquentes en élevage, elles sont responsables de pertes économiques qui fragilisent les exploitations agricoles et impactent le bien-être des animaux. Le développement des connaissances sur l'immunologie des bovins est nécessaire pour améliorer les moyens d'intervention permettant de réduire la fréquence et la sévérité des infections.

L'objectif du projet est d'acquérir de nouvelles connaissances sur les leucocytes sanguins (lymphocytes, monocytes, neutrophiles) des bovins laitiers par l'étude de leurs caractéristiques et de leurs fonctions. Les études réalisées au laboratoire (*in vitro*) à l'aide des cellules isolées du sang d'animaux permettront d'obtenir des indications sur la fonctionnalité de ces cellules. Ces études nécessiteront de prélever du sang sur des vaches laitières élevées en conditions conventionnelles. Un nombre de donneurs de sang suffisant pour la réalisation des travaux tout en évitant une fréquence élevée de prises de sang sera prévu. Une soixantaine d'animaux seront concernés sur la période de 5 ans. Cette période est nécessaire car ces recherches ont un caractère évolutif, en fonction du développement des « outils » (matériels et réactifs) utilisés, et aussi en fonction de l'évolution des concepts et des questions scientifiques.

Le projet est conçu pour être en conformité avec les exigences 3R

Remplacement Comme chez l'homme, le prélèvement de sang est une méthode courante et peu invasive qui permet de ne pas porter atteinte à l'intégrité de l'animal. Les cellules du sang de bovin ne peuvent pas être remplacées par celles d'une autre espèce.

Réduction Trois groupes de 10 vaches Prim'Holstein et de 10 vaches Normandes seront suffisants pour obtenir un nombre d'échantillons de sang statistiquement acceptable sans imposer une répétition excessive des prises à chaque animal donneur.

Raffinement Les prises de sang réalisées à la veine jugulaire ne nécessitent qu'une contention minimale, les animaux étant habitués à être pris au cornadis pour la distribution des aliments. La douleur causée par l'aiguille ne nécessite pas d'anesthésie. Les animaux sont maintenus dans leur environnement habituel.

14791 La sphère cranio-faciale est particulièrement exposée à des pertes osseuses importantes, qui peuvent être d'origine traumatique, pathologique (infections, cancer, ostéonécroses...) ou malformative, et dans lesquelles le défaut de tissu osseux implique des reconstructions difficiles. La prise en charge actuelle est essentiellement chirurgicale (greffe osseuse) mais ce type de traitement est très invasif, n'est pas toujours possible et présente un fort taux d'échec. Le développement d'innovations thérapeutiques est donc un besoin de santé publique. Les approches par ingénierie tissulaire combinant cellules et biomatériaux optimisés apparaissent comme une voie alternative prometteuse. Dans ce contexte les cellules souches de la pulpe dentaire apparaissent comme prometteuses. Nos études sont basées sur un modèle d'ingénierie tissulaire de la sphère cranio-faciale bien décrit dans la littérature. Ce modèle est celui du défaut osseux de calvaria, dit critique car il est trop important pour pouvoir se réparer naturellement. Pour promouvoir la réparation, des matrices de collagène ensemencées de cellules souches pulpaire sont implantées dans la lésion. Les résultats obtenus jusqu'à présent nous ont permis de montrer que ces cellules implantées dans le défaut critique de calvaria permettaient une réparation du défaut et participaient activement à la formation osseuse lors de la réparation. De plus, ils ont suggéré que, selon la façon dont ces cellules étaient cultivées avant implantation dans le défaut, la réparation pouvait se faire soit par formation directe de tissu osseux (processus intramembranaire) soit de façon indirecte avec formation d'une cal cartilagineuse avant la formation osseuse (processus endochondral), comme dans les fractures d'os longs. Le but du présent projet, est d'évaluer l'impact de différentes conditions de culture des cellules souches pulpaire avant implantation, sur le processus de réparation osseuse et de suivre le devenir des cellules implantées dans ce contexte. Sous anesthésie, des craniotomies standardisées sont réalisées à l'aide d'un trépan. Les défauts osseux sont ensuite comblés par différents types de matrices collagéniques contenant les cellules cultivées dans 4 conditions différentes. Les animaux reçoivent une médication postopératoire. A T=0, 2, 4, 8 et 12 semaines après la chirurgie, ils seront étudiés par un examen radiographique par scanner à rayons X sous anesthésie pour évaluer le degré de réparation du défaut osseux. A la fin des procédures les animaux seront mis à mort afin de prélever les calvaria et d'étudier le processus de réparation au niveau cellulaire par des analyses immunohistologiques.

Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum, 100 souris seront nécessaires pour permettre une étude adéquate sur le plan statistique. Pour éviter toute douleur chez la souris, la chirurgie et les séances d'imagerie seront réalisées sous anesthésie générale. Un suivi attentif des signes d'infection et de douleurs avec des antalgiques et des antibiotiques est prévu.

14792 La majorité des maladies infectieuses émergentes dans le monde sont dues à des virus enveloppés (Arbovirus, Rétrovirus, Rhabdovirus...). Ainsi les virus du Chikungunya (CHIKV), du Zika (ZIKV), de la Dengue (DENV), Ebola, de la grippe et le VIH sont responsables d'épidémies majeures, même le virus de la rage est encore un problème dans certains pays. Ces virus sont responsables d'infection invalidantes chez l'homme, mais qui peuvent aller jusqu'à des neuropathologies graves avec des malformations congénitales (microcéphalie) du nouveau-né (ZIKV) ou des décès (Rage, Dengue hémorragique, Ebola, Grippe). Ces 10 dernières années, les arboviroses ont émergé comme des maladies responsables de pandémies, dont le risque est augmenté par le réchauffement climatique. Pour les virus enveloppés, la mise en place de nouvelles générations de vaccins plus rapide à développer, moins coûteux et plus stables est une nécessité. Pour beaucoup, dont ZIKV, cette priorité est très élevée pour protéger les femmes enceintes, le nouveau-né et les personnes immuno-compromises (âge, maladies chroniques, etc.); le développement de vaccins anti-Arbovirus est devenu une priorité en termes de santé publique. Les vaccins classiques basés

sur des virus vivants atténués ont montré leurs limites, en particulier avec l'échec des récents vaccins contre DENV.

Nous proposons une nouvelle génération de vaccins sans virus ni adjuvant, qui est basée sur la présentation d'antigènes viraux par des nanovésicules naturelles, les exosomes. De premières séries d'immunisations ont permis de tester le potentiel des exosomes comme plateforme vaccinale, elles ont démontré que les exosomes pouvaient réellement apporter une solution universelle.

Notre programme propose d'évaluer le potentiel de cette plateforme exosomes vaccinaux comme base d'une nouvelle génération de vaccins sans virus ni adjuvant. Nous prévoyons de tester un maximum de candidats contre plusieurs virus (CHIKV, ZIKV, DENV, Ebola, Grippe, Rage) et d'affiner la formulation de candidats déjà testés contre CHIKV et ZIKV tout en les comparant à des immunogènes protéiques plus classiques.

En ce qui concerne le Remplacement de la règle des 3R, nous pouvons affirmer que le remplacement des modèles animaux n'est pas possible ici et que l'étude des réponses immunitaires et des protections naturelles nécessitent encore l'utilisation de modèles animaux. La vaccination expérimentale chez la souris commune *Mus musculus*, s'impose comme un modèle expérimental pour tester l'immunogénicité et la protection donnée par des candidats vaccins contre ces virus, dont les arbovirus. L'immunogénicité des candidats vaccins sera testée chez la souris adulte BALB/c. La lignée de souris BALB/c est une souris immunocompétente à la différence des souris AG129 souvent utilisées.

Conformément à la règle des 3R, nous réduisons au maximum le nombre d'animaux utilisés avec des essais d'immunogénicité impliquant un effectif total de 396 souris. Afin d'utiliser le minimum de contrôles négatifs, nous effectuons en parallèle les tests de différents immunogènes de virus différents. Ces animaux sont répartis afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs ainsi, nous utilisons des groupes de six (6) individus pour chaque condition de l'étude la bibliographie et nos études antérieures ont montré que cela permettait d'obtenir des résultats statistiquement significatifs avec nos immunogènes à base d'exosomes. Les animaux recevront les immunogènes par voie intradermique (ADN), intrapéritonéale (ADN) ou sous-cutanée (protéine pure ou sur exosomes).

Enfin nous avons mis en place des méthodes de raffinement et points limites pour d'éventuels signes d'inconfort, de stress ou de douleur cela permet de garantir au mieux le bien-être des animaux. L'utilisation de souris BALB/c peu fragiles devrait garantir aussi le bien-être de ces animaux. Les animaux seront hébergés en groupe en portoir ventilé avec enrichissement dans chaque cage.

14793 La littérature récente témoigne d'un intérêt croissant pour les processus empathiques chez les animaux non-humains. L'empathie peut revêtir différentes formes et mettre en jeu des processus émotionnels et cognitifs de degrés variés. Une étude récente menée sur un rongeur monogame, le campagnol de prairie, nous indique qu'un congénère familier stressé suscite une réponse comportementale liée à l'anxiété et à la peur chez un individu 'observateur' ainsi qu'une augmentation de son taux de corticostérone plasmatique proportionnelle à celle de l'individu stressé. Cette contagion émotionnelle qui peut être considérée comme une réponse empathique primitive s'accompagne chez cette espèce par des comportements de consolation manifestés par l'individu observateur.

L'objectif du projet est d'évaluer ces phénomènes de contagion émotionnelle et de consolation chez deux espèces de rongeurs, l'une monogame, la souris glaneuse, l'autre polygyne la souris domestique. Notre hypothèse étant, que ces phénomènes seront davantage présents chez les couples d'espèces monogames, du fait d'un lien sélectif exclusif s'établissant entre les partenaires. Notre protocole prévoit de séparer physiquement mais non visuellement des partenaires sexuels ayant cohabité durant une semaine en soumettant l'un des partenaires à une situation aversive (épreuve de contention). Les comportements et les réponses physiologiques de l'observateur témoin de la contention de son partenaire seront relevés. Les indicateurs physiologiques seront

recueillis de manière non invasive par l'intermédiaire d'une caméra thermique, permettant d'évaluer les réponses du système nerveux autonome de l'animal.

Les deux partenaires sont ensuite réunis. Les comportements affiliatifs prosociaux émanant du sujet 'observateur' à l'égard du partenaire libéré seront alors mesurés et interprétés comme comportements de consolation.

Les conséquences de ces comportements sur le degré d'anxiété de l'individu stressé par la contention sont évaluées par un test comportemental standard, le labyrinthe en croix surélevé.

Cette étude est destinée à préciser le potentiel empathique des souris domestiques et glaneuses, et à caractériser son expression et ses fonctions, ainsi que les mécanismes mis en œuvre.

Les effectifs d'animaux s'élèvent à 80 couples de chaque espèce (160 souris domestiques et 160 souris glaneuses, soit 320 au total), répartis dans 5 groupes expérimentaux de 16 couples chacun.

Deux groupes correspondent à l'évaluation de la contagion émotionnelle et des comportements de consolation manifestés par les mâles d'une part et par les femelles d'autre part.

Deux groupes servent à contrôler l'effet des comportements de consolation sur la diminution de l'anxiété des individus stressés (placés en contention), l'un pour les mâles l'autre pour les femelles stressées. Les comportements de consolation ne seront alors pas possibles pour les individus de ces deux groupes.

Un cinquième groupe sert de contrôle à la situation de contention. L'absence de contention chez les individus de ce groupe servira à évaluer l'effet de cette situation sur les comportements de consolation et d'évaluer dans ce cas de figure l'état d'anxiété "basal" des individus mâles et femelles.

Ces effectifs correspondent aux limites nécessaires à la mise en évidence de différences entre les groupes expérimentaux en tenant compte des fortes variations interindividuelles inhérentes aux souches de souris "sauvages" utilisés dans ces protocoles d'une part et d'autre part à la prise en compte de l'état gestationnel des femelles.

Les couples seront hébergés dans des cages avec des enrichissements (nid de coton, tubes cartonnés). Les manipulations seront effectuées en utilisant des boîtes de transfert évitant la prise en main des animaux. Les animaux manifestant de forts degrés de stress (immobilités toniques durables, faible réactivité aux stimulations environnementales) lors des phases de test seront remis dans leur cage et exclus des expérimentations. Des tubes de contention de différents diamètres seront utilisés de manière à tenir compte de la taille de l'animal (tubes de diamètre de 3 à 4cm).

Ce type d'étude basée sur des mesures comportementales des états empathiques des animaux n'est à ce jour pas remplaçable par une autre méthode que celle employant les animaux eux-mêmes.

14794 Le système olfactif des Mammifères est doté de propriétés remarquables, basées sur le développement de projections sensorielles depuis la périphérie jusque dans le cerveau selon un mode très original qui demeure à ce jour très mal compris. La perception des odeurs commence dans l'épithélium olfactif lorsque les molécules odorantes se lient aux récepteurs des odeurs (RO) exprimés par les neurones sensoriels olfactifs. Il existe environ 1 200 gènes codant des RO dans le génome de la souris. Un neurone sensoriel olfactif n'exprime qu'un seul gène de RO, choisi parmi les 1 200 gènes possibles. De façon remarquable, tous les neurones qui expriment le même RO, bien que dispersés dans l'ensemble de l'épithélium olfactif, projettent sur un petit nombre de minuscules structures du bulbe olfactif (partie olfactive du cerveau), appelés glomérules. Ainsi, lorsque les axones des neurones sensoriels sortent de l'épithélium olfactif, ils se regroupent d'abord avec leurs voisins les plus proches, qui expriment différents RO. On parle alors de fasciculation hétérotypique. Cependant, lorsqu'ils arrivent en périphérie du bulbe olfactif, dans une zone appelée "couche du nerf olfactif", ils se ré-organisent, par un processus de défasciculation et refasciculation homotypique, par lequel tous les axones des neurones exprimant le même récepteur olfactif se regroupent pour converger dans quelques glomérules (2 à 3 glomérules par bulbe olfactif).

Ce processus de réorganisation des axones et de convergence en glomérules spécifiques, qui est largement conservée chez les vertébrés, pose un problème de câblage extrêmement important sur le plan fondamental, qui demeure inconnu. Malgré les efforts considérables qui ont été faits dans de nombreux laboratoires pour identifier les substrats moléculaires de croissance, de coalescence et de ciblage de ces axones, nos connaissances dans ce domaine demeurent très pauvres. L'une des raisons de cette méconnaissance tient à l'absence de données précises concernant la dynamique des interactions de ces axones entre eux, et de leur organisation spatiale fine, en 3 dimensions, dans cette région critique qu'est la couche du nerf olfactif. En vue de combler ces importantes lacunes dans notre connaissance des mécanismes de guidage axonal, nous proposons de caractériser, à l'échelle de la microscopie électronique, l'organisation fine des axones olfactifs et de leurs inter-relations spatiales dans la couche du nerf olfactif. Pour cela, nous allons exploiter les nouvelles possibilités offertes par le développement des méthodes d'Array Tomographie, qui consistent à reconstruire, à partir d'un grand nombre de coupes séries, l'organisation des axones en 3D dans un volume de tissu. Pour cela, nous utiliserons des souris exprimant un marqueur protéique (détectable par immunocytochimie) dans une sous-population de neurones sensoriels olfactifs (les neurones exprimant un RO particulier). Il s'agira de lignées de souris transgéniques qui ont été produites il y a plusieurs années dans d'autres laboratoires, et qui sont disponibles pour nos expériences. Les animaux seront euthanasiés par perfusion avec un fixateur chimique sous anesthésie profonde associée à une antalgie, leur cerveau sera prélevé et traité pour les analyses en microscopie électronique. Les études seront réalisées à différents stades postnataux et chez l'adulte.

Le nombre total de souris utilisées dans ce projet sera de 54.

La règle des 3R a été considérée tout au long de l'élaboration de ce projet et sera appliquée au quotidien. Pour le remplacement, les études *in vitro* ne permettent hélas pas la reconstitution de l'organisation en 3 dimensions des axones sensoriels olfactifs, telle qu'elle existe *in vivo*, et ce phénomène complexe ne peut donc être étudié que chez l'animal. Concernant la réduction, des expériences précédentes nous ont permis de définir le nombre minimal d'animaux permettant de produire des données statistiquement solides. Concernant le raffinement, pour toute cette étude, les animaux seront hébergés avec un cycle jour/nuit adapté et avec la boisson et la nourriture ad libitum. Ils feront l'objet d'un contrôle quotidien par une personne compétente. Ces contrôles doivent permettre de repérer tout animal malade ou blessé et de prendre les mesures appropriées. Ces contrôles seront enregistrés. Des méthodes seront mises en place pour réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et l'anxiété des animaux (injection d'antalgiques ou bien mise à mort par injection d'une surdose d'anesthésique).

Ce travail permettra de combler une lacune importante de nos connaissances sur ce mode original de projections axonales, et de poser de nouvelles hypothèses sur les mécanismes impliqués.

14795 L'objectif du projet est d'évaluer l'impact de la sélection génétique pour améliorer l'efficacité alimentaire de tilapias *Oreochromis niloticus*.

Actuellement, il existe globalement deux méthodes de mesures de l'efficacité alimentaire chez les poissons. La première est d'élever chaque poisson dans un aquarium isolé et de suivre la croissance de chaque poisson en fonction de ce qu'il consomme. La seconde méthode consiste à élever des poissons en petits groupes et par identification visuelle de chaque poisson, de compter le nombre de granulés consommés par chacun et sa croissance. C'est cette seconde méthode qui sera utilisée dans la présente expérience, car bien que chronophage en analyses, elle permet d'élever les poissons en groupes et de nourrir les poissons avec des rations optimales.

Le projet sera réalisé sur deux générations de reproduction

- la première génération sera issue d'un croisement entre des mâles sélectionnés précédemment pour avoir une très bonne ou une très mauvaise efficacité alimentaire et des femelles non sélectionnées

- la seconde génération sera issue du croisement entre les mâles et les femelles les plus efficaces (pour la lignée +) et entre les mâles et les femelles les moins efficaces (pour la lignée -)

L'idée de cette étude est d'évaluer l'impact de la sélection pour leur efficacité alimentaire sur plusieurs générations. A chaque génération, les poissons, identifiables visuellement individuellement seront nourris par granulés pour plusieurs repas consécutifs. Ces repas seront filmés, et par la suite, un comptage du nombre de granulés consommé par chaque poisson à chaque repas sera réalisé. Cela permettra, avec le suivi de croissance, de calculer l'efficacité alimentaire précise de chaque poisson, et donc l'impact de la sélection. L'impact n'étant probablement pas visible après seulement une génération de sélection, nous souhaitons réaliser cette expérience sur deux générations successives pour augmenter les écarts d'efficacité alimentaire entre les lignées + et -. A chaque génération, 500 poissons seront mesurés pour leur efficacité alimentaire (250 poissons par lignée), soit un total de 1000 poissons.

Le projet a été établi pour prendre en compte la règle des 3R. La comparaison des poissons issus de mâles très efficaces et de mâles très peu efficaces est la seule méthode permettant de mettre en évidence la possibilité de sélectionner les poissons sur ce caractère d'intérêt dans le développement durable de l'aquaculture. Les effectifs ont été calculés à partir des connaissances que nous avons acquises au cours de précédentes expérimentations (Réduction). Une grande partie des poissons seront conservés pour une possible nouvelle étude concernant la résistance aux pathogènes et l'utilisation de plantes médicinales comme alternative aux antibiotiques.

Pour réduire la souffrance et l'angoisse, les animaux sont manipulés uniquement sous anesthésie pour toutes les mesures individuelles et sont disposés dans des aquariums leur permettant de nager librement. De plus des tubes PVC sont placés dans les bassins de groupes pour permettre aux poissons de se cacher si besoin (Raffinement).

Ce protocole ne comporte pas de Remplacement, la mesure sur les poissons des caractères étant pour l'instant nécessaire.

14796 Contexte scientifique médical et social

La corticosurrénale est une glande endocrine qui, par ses sécrétions hormonales permet de maintenir l'équilibre hydrominéral (minéralocorticoïdes) et glucido-lipidique (glucocorticoïdes) du corps malgré les variations quotidiennes des apports et des besoins nutritionnels. De ce fait et par ses réponses rapides, elle constitue le principal organe de réponse au stress. Ces fonctions indispensables à la vie sont supportées par une organisation de la glande en zones concentriques de cellules spécialisées sécrétant des hormones stéroïdes : la zone glomérulée (sécrète les minéralocorticoïdes) à l'extérieur et la zone fasciculée (sécrète les glucocorticoïdes) en position interne. Les mécanismes responsables du maintien de cette organisation sont encore largement incompris.

La SUMOylation est une modification des protéines réversible consistant en la liaison d'un peptide SUMO sur une protéine cible. Cette réaction est très dynamiquement contrôlée par le jeu d'enzymes de conjugaison et de déconjugaison (isopeptidases Senp) des peptides SUMO. Cette modification est essentielle aux mécanismes cellulaires fondamentaux comme le maintien de l'organisation du noyau cellulaire, la division cellulaire ou l'adaptation aux stress génotoxiques (affectant l'intégrité de l'ADN). De ce fait, toutes modifications généralisées des capacités de SUMOylation (incapacité totale ou sur-capacité) chez des souris génétiquement modifiées conduisent à une mort embryonnaire précoce. Cependant, une modification de la SUMOylation non pas générale à toutes les cellules, mais limitée dans le temps ou l'espace révèle son importance dans le contrôle des programmes de développements (formation des organes chez l'embryon) et de maintien de l'intégrité des organes (renouveler les tissus en évitant le cancer).

Description des objectifs et du projet bénéfiques/dommages

L'objectif de ce projet est d'explorer le rôle de la SUMOylation dans le maintien et la différenciation fonctionnelle du cortex surrénalien. Dans ce but nous allons développer des souris génétiquement modifiées présentant une hyperSUMOylation suite à l'inactivation du gène codant l'isopeptidase Senp2 dans les cellules sécrétrices de la corticosurrénale dès la vie embryonnaire ou après la naissance. Nous rechercherons les conséquences de l'hyperSUMOylation sur le développement embryonnaire et postnatal de la surrénale par des approches immunohistologiques et moléculaires

et nous pratiquerons des explorations fonctionnelles de la fonction endocrine qui seront interprétées par des dosages hormonaux plasmatiques.

Ce projet concerne l'étude de l'organogenèse et l'exploration fonctionnelle d'un organe de réponse au stress dont l'activité est soumise à un rétrocontrôle hypothalamo-hypophysaire. Il n'existe aucune méthode alternative permettant d'intégrer ces différents niveaux de complexité.

Règle des 3R

L'étude du rôle de la SUMOylation dans la zonation fonctionnelle de la glande corticosurrénale est à ce jour inédite et accroîtra notre connaissance des mécanismes de réponse au stress et d'organogenèse des glandes endocrines. Elle requiert l'analyse intégrée des communications entre les types cellulaires constituant le cortex (cellules vasculaires, immunitaires, stéroïdogènes, capsulaires, neuroendocrines) ainsi que leur suivi au cours du développement. Par conséquent ces études doivent être réalisées chez la souris car aucune solution alternative n'est à même de reconstituer cette complexité.

L'ensemble de l'étude prévoit l'utilisation au maximum de 530 animaux sur 5 ans. Une étude préliminaire portant sur 80 animaux permettra de tester l'innocuité des modifications génétiques de ces animaux. L'étude principale prévoit l'utilisation de 360 animaux, qui correspondent à 4 groupes de 10 animaux (2 groupes de chaque sexe) étudiés à 9 âges différents.

Enfin, uniquement en cas de défauts détectables à la naissance, une étude sur le développement embryonnaire utilisera 90 animaux.

Aucun stress ni douleur ne sont attendues suite aux modifications génétiques prévues dans cette étude. Toutefois, les animaux seront observés quotidiennement afin de suivre leur état général (perte de poids, comportements anormaux). Une grille de score permettra d'évaluer de façon objective l'état général des animaux et de les exclure de l'étude si besoin. Les animaux seront élevés dans un milieu enrichi (tunnel de carton, copeaux permettant de nicher, compartimentalisation de la cage).

14797 Les cellules cancéreuses ont la particularité de recruter les vaisseaux sanguins afin de promouvoir et soutenir le développement tumoral et sa progression grâce à l'apport d'oxygène et de nutriments. Des traitements, dits anti-angiogéniques, inhibent le réseau vasculaire tumoral et ralentissent la progression de certains cancers. Néanmoins, ils induisent des résistances qui entraînent fréquemment des récurrences métastatiques. Nous avons récemment montré grâce à des modèles cancéreux chez la souris que le système nerveux est également sollicité dans le contrôle du développement des tumeurs primaires et des métastases. Les nerfs sympathiques régulent l'initiation tumorale alors que les nerfs parasympathiques contrôlent le processus métastatique. Chez l'Homme, nous avons montré que l'agressivité des tumeurs prostatiques et leur évolution clinique sont significativement associées au degré d'innervation du cancer.

Dans ce projet, nous proposons d'étudier la néo-neurogénèse tumorale et le rôle des nerfs dans la tumorigenèse. La néo-neurogénèse tumorale sera étudiée par l'étude de la migration de progéniteurs neuronaux du système nerveux central vers la tumeur. Cette migration sera mise en évidence grâce à la transduction de précurseurs neuronaux des zones neurogéniques du cerveau par un vecteur lentiviral, exprimant le gène rapporteur Tomato. Ce vecteur lentiviral sera injecté par stéréotaxie sous anesthésie générale. Le rôle des nerfs dans la formation des vaisseaux sanguins intra-tumoraux à différents stades du développement de la tumeur sera défini et le rôle des voies de signalisation nerveuses sur le développement de la tumeur et sa résistance aux thérapies anti-angiogéniques sera étudié.

Aucune modélisation *in vitro* ne permet d'appréhender le développement concomitant des nerfs et des vaisseaux en 3D au sein d'un adénocarcinome. L'utilisation de modèles animaux est donc nécessaire pour tester et valider nos hypothèses de travail avant la réalisation d'essais cliniques chez l'Homme. Comme dans nos études déjà publiées, nous utiliserons deux modèles tumoraux 1 : des cellules tumorales prostatiques humaines greffées dans la prostate de souris immunodéficientes 2 : des tumeurs de la prostate transgéniques, qui reproduisent *in vivo* le développement de tumeurs humaines.

Nous utiliserons 804 rongeurs nés et élevés dans un établissement agréé. Ce nombre correspond au minimum nécessaire pour valider statistiquement les conclusions scientifiques. L'ensemble des protocoles expérimentaux a été conçu pour minimiser les effets indésirables et la détresse des animaux

- Les animaux seront hébergés dans une zone protégée et silencieuse dédiée à ce projet, en groupe de 5 individus par cage. Leur environnement est enrichi afin de maintenir leur bien-être tout au long de l'expérimentation.

- La fonction des innervations adrénergique sympathique et cholinergique parasympathique sera caractérisée par ablation nerveuse chimique ou chirurgicale, ainsi que par voie pharmacologique et génétique.

- Les prélèvements de sang les actes chirurgicaux et les tatouages seront effectués sous anesthésie.

- Le développement tumoral et sa progression seront suivis sous anesthésie générale par imagerie bioluminescente, échographie Doppler avec et sans produits de contraste. et tomographie par émission de positons (TEP).

- Des critères d'arrêt sont également prévus (poids, taille des tumeurs, animaux prostrés et/ou isolés, caractéristiques du pelage), sous le contrôle du vétérinaire de l'établissement, afin d'éviter toute souffrance des animaux et déviance des protocoles.

14798 Le processus de réparation spontané et naturel du tissu osseux n'est pas assuré lors d'un traumatisme trop étendu, ou d'un prélèvement sur une grande surface d'os après l'extraction d'une tumeur osseuse par exemple. Dans ces situations, l'autogreffe osseuse est le traitement de référence mais présente des inconvénients, notamment de morbidité du site de prélèvement et de quantité disponible. L'ingénierie tissulaire osseuse se développe depuis plusieurs années afin d'offrir une alternative à l'autogreffe osseuse en associant des biomatériaux à des cellules souches capables de former de l'os et de promouvoir la revascularisation du site afin de régénérer le tissu osseux. La principale limitation de cette approche est que les cellules implantées ne survivent pas suffisamment longtemps pour induire le nouveau tissu en quantité suffisante pour combler le défaut osseux. Cette mortalité serait due aux conditions ischémiques (manque d'oxygène et de nutriments) subies par les cellules après implantation jusqu'à la vascularisation de l'implant. D'ailleurs, le manque de glucose (et non d'oxygène) entrainerait la mort massive et rapide des cellules après implantation. De précédentes expérimentations ont démontré qu'apporter du glucose aux cellules augmentait significativement leur survie dans des modèles *in vitro*.

L'objectif de ce projet est d'évaluer *in vivo* un produit d'ingénierie tissulaire osseux (PITO) supplémenté en continue par du glucose, sur la viabilité et la fonctionnalité (potentiels à induire des vaisseaux sanguins et à induire de l'os) des cellules souches ostéoprogénitrices. Ce PITO sera constitué d'une céramique poreuse à base d'hydroxyapatite carbonatée obtenue par l'impression en 3D percée d'un canal central et dont l'architecture poreuse permettra une perfusion homogène du glucose. En effet, les modèles exclusivement *in vitro* ne permettent pas de prédire de façon fiable et précise la survie des cellules en ischémie car divers paramètres interviennent (tels que l'inflammation) et encore moins de prédire la néo-vascularisation (formation de vaisseaux sanguins) et néoformation osseuse (formation d'os), car tous ces processus font appel à plusieurs types cellulaires.

Deux études sont prévues pour évaluer les paramètres suivants : viabilité des cellules implantées, potentiel des cellules à induire des vaisseaux sanguins, potentiel des cellules à induire de l'os et l'expression génique des cellules implantées.

1re étude un modèle d'implantation sous-cutané chez le rat sera utilisé pour le criblage des différents implants (de concentrations différentes de glucose et de cellules) en évaluant aisément la viabilité des cellules implantées par imagerie bioluminescente, une technique non-invasive, ainsi que le potentiel de la formation de vaisseaux sanguins et la formation ostéogénique propre des implants (en absence de tout contact osseux). La validation de l'efficacité thérapeutique des PITO chez le rat en site non-osseux permettra d'exploiter par la suite ces résultats en site osseux, c'est-

à-dire dans des grandes pertes de substances osseuses, après sélection (donc diminution) de groupe du PITO ayant donné le meilleur résultat au cours de ces études.

2ème étude le modèle de l'ostéotomie diaphysaire fémorale dans le rat sera utilisé pour évaluer le PITO en rapport avec un milieu clinique des grandes pertes d'os. La formation de vaisseaux sanguins autour des PITOs sera évaluée aux différents temps (mise à mort des animaux). La formation osseuse induite par les cellules des PITOs sera également effectuée par un suivi longitudinal par imagerie rayons X, une technique non-invasive. A la fin de chaque procédure, les PITOs seront explantés pour des analyses génique et histologiques afin de compléter/approfondir les résultats. L'ensemble du projet d'une durée de 5 ans, nécessite l'utilisation de 308 rats Lewis.

Afin de réduire le nombre d'animaux, le modèle sous-cutané sera utilisé avec 2 PITOs implantés par animal. Par ailleurs, des techniques d'imagerie non-invasive permettant un suivi longitudinal d'un même animal seront utilisées pour suivre la viabilité des implants cellularisés et leur potentiel à former de l'os. Enfin, les études cinétiques de formation de vaisseaux sanguins et de formation osseuse n'incluront pas les PITOs à l'intérieur desquels les cellules ont montré une survie nulle 24 heures après implantation. Une période d'acclimatation d'une semaine avant l'entrée dans le protocole est accordée aux animaux. Une analgésie sera effectuée en pré- et post-opératoire suivie d'une observation régulière de l'animal jusqu'à la fin des procédures respectives. Des points critiques précis seront surveillés permettant d'objectiver la douleur ou la gêne (grille scorée). Au cas où des douleurs ou souffrances persistent en dépit des traitements entrepris, la décision de mise à mort sera prise selon des critères préétablis. Afin de favoriser l'environnement social, les animaux seront hébergés par groupe de 3 dans les conditions standards de l'animalerie; eau et nourriture ad libitum température entre 20 et 22°C avec un cycle jour/nuit de 12h/12h. Chaque cage sera identifiée, et les rats resteront dans la même cage du début à la fin du protocole. Enfin, un environnement enrichi et adapté sera fourni, contribuant entre autre à l'usure des dents et au foussement des animaux.

Les résultats contribueront à plus long terme à la mise au point de traitements des grandes pertes de substance osseuse chez l'Homme.

14799 Le contexte de nos études est le développement de thérapies innovantes contre le cancer du sein, en particulier les cancers résistants pour lesquels il n'existe pas de traitements efficaces. Dans ce cadre, nous souhaitons tester le potentiel antitumoral de nouveaux composés issus de nos travaux de recherches, et leur synergie avec des traitements existants, dans des modèles murins de xénogreffes de cellules tumorales. Une première expérience consistera à déterminer les doses optimales et sous optimales pour notre molécule d'intérêt et pour le Taxol, molécule référence (à partir de doses évoquées dans la littérature). La deuxième partie de l'étude consistera à montrer un effet synergique de la combinaison des 2 traitements. A partir d'une chimiothèque (collection de molécules chimiques) de 8000 composés, nous avons par une série de tests sur cellules en culture *in vitro*, sélectionné 15 molécules d'intérêt. Grace à des tests complémentaires (dont des tests de toxicité *in vitro*) ainsi qu'une analyse approfondie de la littérature disponible concernant la toxicité des classes chimiques des molécules considérées, nous avons focalisé nos efforts sur 1 composé, constituant le candidat le plus prometteur de ce projet.

La première partie de l'étude (détermination des doses optimales) s'effectuera sur souris porteuses de tumeurs mammaires orthotopiques exprimant la luciférase.

Les volumes tumoraux seront suivis et mesurés au pied à coulisse (3 fois/semaine), et en imagerie de bioluminescence (1 fois/semaine). Nous espérons dégager de cette étude les doses optimales et sous optimales pour les deux molécules, qui seront utilisées dans l'étude de synergie.

La deuxième partie de l'étude (effet synergique de la combinaison des 2 traitements) s'effectuera sur souris porteuses de tumeurs mammaires orthotopiques exprimant la luciférase.

Les volumes tumoraux seront suivis et mesurés au pied à coulisse (3 fois/semaine), et en imagerie de bioluminescence (1 fois/semaine). Nous espérons montrer ici une potentialisation due à la combinaison des deux molécules, visible à la fois sur le volume tumoral, le signal de bioluminescence et l'envahissement métastatique.

60 Souris NRMI nues seront utilisées pour cette étude.

Conformément à la règle des 3R :

Il est indispensable d'intégrer le fait que les molécules seront testées dans un organisme vivant. Le modèle murin nous semble le plus approprié, il permet de se rapprocher d'un grand nombre des caractéristiques de la physiologie humaine.

Remplacer Les tests *in vitro* ont permis de réduire le nombre de composés à tester. Ces études précliniques sont nécessaires avant de réaliser des essais cliniques chez l'homme.

Réduire L'approche statistique et notre expérience nous permettent de réduire le nombre d'animaux au minimum afin d'obtenir des résultats exploitables. Toutes les souris seront utilisées, sachant qu'une tumeur qui ne se développe pas constitue quand même une information scientifique qui sera prise en compte. Les nombres de souris indiqués par condition sont nécessaires pour une analyse statistique fiable, évitant de refaire l'expérience.

Raffiner Nous utiliserons des souris immuno-déprimées, qui représentent un modèle proche de la physiopathologie humaine, et permettant le développement de modèles tumoraux humains sans phénomène de rejet. Les animaux seront hébergés en groupes sociaux, dans un environnement contrôlé dépourvu de pathogènes, enrichi avec des tunnels en carton et morceaux de papier pour y faire un nid. La nourriture et l'eau de boisson sont fournies ad libitum. La croissance des tumeurs n'entraîne pas de gêne et sera suivie régulièrement au pied à coulisse et par imagerie de bioluminescence. Les séquences d'imagerie sont réalisées sous anesthésie gazeuse. La température de l'animal est monitorée et régulée par un tapis chauffant, la déshydratation oculaire est limitée par l'application d'un gel ophtalmique. L'application de critères d'arrêt et le suivi quotidien des animaux garantiront leur bien-être, et nous permettront d'intervenir immédiatement de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance (selon le degré de souffrance Cf 3.4.13 surveillance accrue, injection de buprénorphine, jusqu'à l'euthanasie de l'animal si nécessaire)

14800 Lorsqu'ils sont infectés, les tissus subissent des dommages dus non seulement à l'infection elle-même, mais aussi aux mécanismes de défense mis en place pour supprimer le pathogène. Il est donc nécessaire pour l'organisme de réparer ces dommages une fois l'infection contrôlée, afin que le ou les organes touchés conservent leur fonction. C'est le cas notamment des poumons suite à une infection virale telle que la grippe, mais à l'heure actuelle, les mécanismes de réparation sont mal connus.

Grâce à des analyses chez l'homme et sur des échantillons de souris *ex vivo* (prélevés sans expérimentation sur l'animal), nous savons que certaines cellules immunitaires très nombreuses au niveau des poumons sont capables de sécréter des molécules importantes pour la cicatrisation. De façon intéressante, il a été montré récemment que ces cellules sont importantes pour la survie des animaux suite à l'infection par un virus de la grippe. De plus, ces cellules sont activées dans le sang des patients suite à une grippe grave, et leurs caractéristiques, ainsi que de nombreuses données de la littérature sur diverses pathologies permettent de penser qu'elles migrent au lieu de l'infection (le poumon). Nous savons donc que l'infection grippale active ces cellules, et leurs caractéristiques particulières laissent à penser qu'elles pourraient être impliquées dans la réparation tissulaire nécessairement mise en place lors du processus de guérison.

L'objectif de travail est donc d'étudier les propriétés réparatrices de ces cellules. Cela sera testé grâce à un modèle murin d'infection pulmonaire par un virus, ce qui génère des dommages tissulaires.

En plus d'être très nombreuses au niveau des poumons, et notamment chez l'homme, ces cellules présentent une autre caractéristique intéressante elles reconnaissent des dérivés de molécules bactériennes, que nous savons synthétiser, et ont des propriétés anti-bactériennes. Cela nous permettrait de les manipuler afin de stimuler 1) leur pouvoir de cicatrisation (si notre hypothèse se confirme) et 2) la défense contre les infections bactériennes surajoutées, qui sont une des causes de décès lors des gripes.

Nombre d'animaux pour ce projet 2022 souris.

Remplacer Le système immunitaire est un système dynamique dont les acteurs évoluent entre différentes localisations au sein de l'organisme selon des flux très précis. De plus, les microenvironnements présents dans les différents organes sont très spécifiques. Enfin, certaines populations cellulaires du système immunitaire acquièrent des fonctions particulières en fonction de l'organe dans lequel elles sont situées. Ainsi, nos cellules d'intérêt ont, dans le poumon, des caractéristiques différentes de celles du sang ou de tout autre organe. Ni les modélisations mathématiques, ni les systèmes *in vitro* ne permettent de reproduire cela, ce qui nous oblige donc à utiliser des animaux afin d'étudier les bonnes cellules au bon endroit, et au bon moment. Cependant, les données existantes de la littérature et les résultats préliminaires nous permettent d'orienter notre travail sur une implication de ces cellules dans la réparation tissulaire. En effet, elles expriment spontanément des médiateurs importants pour les processus cicatrisation.

Réduire Le nombre de souris à utiliser a été calculé pour obéir aux minima nécessaires à des analyses statistiques valides, condition nécessaire pour une interprétation biologique des résultats.

Raffiner Les animaux seront suivis quotidiennement afin d'assurer leur bien-être et pour surveiller les éventuels signes de douleur, de souffrance ou de stress. Des points-limites ont été établis. La dose de virus utilisée sera diminuée au maximum pour permettre aux animaux de guérir spontanément au bout de 10 jours.

14801 La paraostéarthropathie neurogène (POAN) aussi appelée ossification hétérotopique neurogène (OHN) est une complication fréquente chez le patient atteint de lésions traumatiques de la moelle épinière. Cette maladie implique la formation d'une excroissance osseuse en bordure d'une articulation. Pour le moment, le diagnostic repose sur l'imagerie et le seul traitement efficace reste la résection chirurgicale. La POAN est douloureuse et d'autant plus invalidante qu'elle diminue les chances de récupération fonctionnelle de patients déjà lourdement atteints.

Malheureusement, il est difficile d'étudier la physiopathologie de cette maladie chez l'homme compte tenu des besoins de prélèvements répétés des organes vitaux comme la moelle épinière. Chez la souris, il existe un modèle d'OHN chirurgical lorsque l'on associe une lésion médullaire à une injection de toxine intramusculaire. Cette lésion et la réaction inflammatoire induite entraînent la formation d'un ostéome en 14 jours. La voie de signalisation Nrf2 est impliquée dans la régulation de la réponse anti-inflammatoire et la différenciation ostéoblastique et ostéoclastique nécessaire à la formation osseuse. Afin de comprendre l'implication de Nrf2 sur l'évolution de l'OHN, nous étudierons les souris sauvages, hétérozygotes Nrf2 +/- et homozygotes Nrf2 -/- issues de mêmes portées pour éviter les animaux surnuméraires (réduire). En fonction des résultats obtenus (raffiner/réduire), nous utiliserons un traitement modulateur de Nrf2 chez des animaux sauvages lésés médullaires et injectés afin de modifier la formation osseuse.

Dans le respect des 3R (réduire, raffiner, remplacer), nous utiliserons un nombre total de 1160 souris sur 5 ans, nombre optimal qui prend en compte la puissance des tests statistiques envisagés (n=10 par groupe). Afin de respecter le bien-être des animaux, nous porterons une attention particulière à l'hébergement (en groupe lorsque c'est possible), la nourriture et la boisson (à volonté et dont l'accès sera facilité après la chirurgie), la litière et l'enrichissement (pour éviter le stress), au suivi quotidien de la physiologie de l'animal (température, poids, état et aspect physique, comportement), pour mettre en place une action rapide en cas de souffrance. Des analyses biochimiques et histologiques seront pratiquées dans différents prélèvements.

14802 La première cause de mortalité en France est liée au cancer. Le cancer est une maladie caractérisée par une prolifération cellulaire anormalement importante au sein d'un tissu normal de l'organisme. Notre projet porte sur l'étude de la capacité des cellules dérivées de la crête neurale (CdCN) qui jouent un rôle clé dans le processus de régénération à contrôler la prolifération des cellules cancéreuses. Notre groupe a récemment montré que le processus de régénération chez le jeune embryon de souris passe par une étape de prolifération cellulaire importante, qui est contrôlée et orientée par des CdCN. L'objectif de notre projet est d'identifier le rôle des CdCN à limiter la progression des cellules tumorales.

Dans ce contexte, les expériences que nous souhaitons réaliser consistent à injecter des cellules cancéreuses humaines à des souris qui développeront ainsi une tumeur localisée. La co-injection des CdCN et des cellules cancéreuses et l'utilisation d'une technique d'imagerie adaptée, nous permettra d'étudier le rôle des CdCN sur le développement de tumeur de manière non-invasive.

Pour cela, nous réaliserons une expérience de deux semaines sur 60 souris de manière à tenir compte de la règle des 3R.

En effet, toutes les dispositions seront prises pour respecter cette règle des 3R

- Réduction le nombre d'animaux a été calculé avec le minimum nécessaire pour mettre en évidence des différences significatives sur les paramètres à mesurer

- Raffinement toutes les mesures seront prises pour réduire la souffrance des animaux. Le milieu d'hébergement sera enrichi (carrés de cellulose, copeaux de litière) et les animaux seront surveillés quotidiennement. Les protocoles utilisés sont de degré de sévérité modéré dans le cas où certains signes de souffrance seraient observés, un traitement oral avec du paracétamol serait mis en place.

- Remplacement Afin de proposer une nouvelle cible thérapeutique chez l'homme, il est important de démontrer l'efficacité thérapeutique des cellules embryonnaires dans un modèle pré-clinique pertinent chez l'animal. Des modèles *in vitro* ne suffisent pas seuls à évaluer l'efficacité de ces cellules.

14803 Chez les mammifères, la croissance et la différenciation des ovaires débutent pendant la vie du fœtus et se poursuivent jusqu'à la puberté. Ces phénomènes sont régulés par des signaux hormonaux complexes et encore mal connus. L'objectif de nos travaux est de mieux comprendre ces régulations, pour permettre l'amélioration de l'efficacité de la reproduction dans le domaine agronomique ou la prise en charge des anomalies du fonctionnement ovarien chez la femme.

La demande d'autorisation concerne la mise en place d'un protocole expérimental de traitement hormonal de lapines après leur naissance (pubères ou non) pour analyser la compétence des ovaires à répondre à ce traitement. Notre question est de savoir si le traitement hormonal peut modifier la croissance des follicules ovariens (structures de l'ovaire au sein desquelles se produit la différenciation des ovocytes). Les réponses obtenues nous permettront de progresser dans la compréhension du rôle de gènes qui pourraient intervenir dans ces mécanismes.

Les travaux seront faits chez le lapin, espèce modèle pour nos études de la fonction de reproduction. Nous développons dans ce but au laboratoire des lignées de lapins génétiquement modifiés (GM). Des lapines de ces différentes lignées de lapins GM ou non (témoins non GM) seront ainsi analysées.

Nous étudierons la qualité des ovocytes produits, et leur compétence à la production d'embryons viables, capables de donner naissance ou pas à des petits. Pour cela, nous analyserons les embryons produits après saillie des femelles hormonalement stimulées. Nous étudierons leur compétence au développement après transfert chez une femelle hormonalement préparée à la gestation. Ce transfert est nécessaire pour que la gestation se déroule sans être perturbée par les traitements ou la modification génétique de la femelle donneuse.

Le protocole expérimental comporte pour chaque femelle des injections d'hormones ou analogues ou inhibiteurs. Plusieurs prises de sang seront effectuées pour suivre l'évolution des paramètres sanguins au cours de l'expérimentation (dosages hormonaux). Dans le cas de femelles pubères mises en expérimentation, une saillie avec un male sera effectuée. Les embryons seront récoltés après abattage de la femelle, puis transférés dans les voies génitales d'une femelle receveuse traitée par hormones ou analogues pour développer une gestation. Des échographies pourront être pratiquées chez les femelles donneuses et receveuses pour suivre l'évolution de la taille des ovaires, détecter la gestation, et analyser le développement foetal. Les gestations peuvent être menées à terme jusqu'à la naissance des petits. L'état de santé des animaux des portées pourra être analysé.

Ce protocole nécessite le recours aux animaux car aucun modèle *in vitro* ne permet de récapituler la complexité de l'organisation d'un ovaire, du développement embryonnaire, et de la gestation jusqu'à la naissance.

Des lots d'animaux GM (6 au maximum) et non GM (6 témoins) seront constitués. Le nombre d'animaux (6 + 6) par lot est établi pour prendre en compte les éventuelles variations individuelles. Une durée de 5 ans est demandée pour le projet. Vingt lots (pour un total de 240 lapins) pourront ainsi être analysés au cours des 5 ans à venir.

Les traitements par des hormones, ou par des inhibiteurs ou des analogues d'hormones et de vitamines ont des effets parfois connus. Certains n'entraînent pas d'effets délétères, d'autres peuvent en entraîner. La surveillance des animaux sera donc effectuée tout au long de l'expérimentation pour détecter tout signe de souffrance, les réduire si possible, ou euthanasier l'animal en cas de besoin même avant la fin du protocole si nécessaire.

Le transfert des embryons est un acte chirurgical pour lequel toutes les précautions seront prises afin de réduire au maximum la douleur et favoriser la récupération de l'animal après son réveil.

Toutes les précautions seront prises pour gérer de façon optimale les douleurs éventuellement engendrées :

- surveillance des animaux dans l'élevage pour détecter les signes d'altération de la santé. Les procédures opératoires seront raffinées autant que possible (anesthésie, analgésie, soins post opératoires).

- demande d'intervention auprès des vétérinaires présents sur le centre (dans l'unité, au sein de l'unité élevage du centre) ou du vétérinaire sanitaire responsable du bâtiment. Les recommandations du vétérinaire seront alors suivies pour soigner l'animal et supprimer la douleur. Si les soins n'apportent aucun résultat positif, l'animal sera euthanasié.

Des précautions comportementales seront mises en place. Elles sont classiquement mises en oeuvre dans l'élevage les animaux sont isolés dans leurs cages. Les cages sont grillagées ce qui permet aux animaux d'avoir des contacts visuels. Chaque cage est agrémentée d'une mezzanine pour permettre à l'animal de se déplacer dans un plus grand espace. Des enrichissements sont proposés aux animaux (balles type ping-pong). L'environnement (bruit, odeurs, lumière, température, hygrométrie) est contrôlé et maintenu stable au cours du temps.

14804 La xénothérapie est un domaine d'avenir qui englobe toutes les thérapies à partir de tissus animaux, dévitalisés ou vivants ou de molécules d'origine animale. Les connaissances actuelles dans ce domaine ne permettent pas d'envisager la production de tous ces produits par des méthodes "*in vitro*". La production de ces molécules, tissus et organes à visée thérapeutique humaine par des animaux vivants est donc une méthode qu'il est nécessaire de développer.

Un obstacle majeur à cette stratégie est le rejet par l'organisme humain de tout matériel issu d'un organisme animal. Le projet a donc pour objectif la production d'une lignée de lapins qui pourraient être utilisés dans ce domaine. La modification génétique consiste à supprimer le fonctionnement d'un des gènes responsables de la présence de certaines molécules à la surface de toutes les cellules d'un individu. Ces molécules sont à l'origine de l'identité de chaque individu, le "soi", qui diffère d'un individu à l'autre et donc qui exclut la possibilité de dons d'organes, de tissus, de cellules entre individus d'origine éloignée. Supprimer le fonctionnement de ce gène chez le lapin permettrait de supprimer la présence de ces molécules à la surface des cellules chez le lapin, de réduire les rejets et rendrait possible l'utilisation de ces lapins génétiquement modifiés pour fournir des produits utilisables dans les divers domaines de la xénothérapie.

La production de lapins génétiquement modifiés sera effectuée par la technique de « gene editing ». Cela consiste à injecter dans l'embryon unicellulaire de lapin une nucléase, enzyme qui cible une région choisie du génome et provoque l'introduction de mutations à l'origine de l'arrêt du fonctionnement du gène.

Le protocole comprend diverses étapes

- la saillie de lapines ayant reçu un traitement hormonal de superovulation,

- la récupération des embryons unicellulaires par euthanasie des lapines, et l'injection de l'enzyme de modification,
- leur transfert dans les voies génitales d'une lapine receveuse,
- l'élevage des petits après leur naissance, l'analyse de leur génotype et de leur phénotype,
- la reproduction des animaux de génotype intéressant pour obtenir au moins un lapin male chez lequel le fonctionnement du gène a été arrêté.

Le protocole prévoit d'utiliser au maximum 80 animaux adultes répartis sur les différentes étapes. Ce nombre a été estimé en considérant que la prolificité de nos animaux se situe dans la moyenne généralement observée dans les élevages et en considérant notre taux moyen de réussite pour les expérimentations engagées. Cependant, pour utiliser le moins d'animaux possible, le protocole expérimental a été fractionné en étapes. A chaque étape du protocole, un objectif est fixé. C'est uniquement lorsque l'objectif est atteint que l'étape suivante peut être engagée. Par exemple, un premier lot d'animaux est introduit dans la première étape expérimentale. L'analyse des résultats est faite dès que possible. En cas de succès, la première étape est considérée comme acquise, aucun nouvel animal n'est introduit dans cette étape. Des animaux sont introduits dans la deuxième étape et ainsi de suite. Un nombre maximal de tentatives est fixé pour chaque étape, nombre qui a été établi sur la base de notre savoir faire, et au delà duquel nous estimons que la répétition de l'expérimentation n'aurait aucun intérêt (une modification des méthodes est alors éventuellement envisagée).

Toutes les précautions sont prises pour utiliser les animaux dans des conditions telles que les souffrances éventuellement engendrées sont réduites au maximum

- surveillance des animaux dans l'élevage pour détecter les signes de souffrance ou d'altération de la santé.
- demande d'intervention auprès des vétérinaires présents sur le centre (dans l'unité, au sein de l'unité élevage du centre) ou le vétérinaire sanitaire responsable du bâtiment. Les recommandations du vétérinaire sont alors suivies pour soigner l'animal ou supprimer la douleur.
- dans le cas de femelles en gestation, si la mise bas n'a pas eu lieu à la date théorique, une détection de la gestation peut être faite (échographie, palpation). Une césarienne peut être pratiquée et les petits adoptés par une femelle de l'élevage au cas où la mère n'est pas capable d'allaiter ses petits.

Des précautions comportementales sont mises en place les animaux sont isolés (1 animal par cage) après leur sevrage (7 semaines après la naissance environ). Les cages sont grillagées ce qui permet aux animaux d'avoir des contacts visuels. Chaque cage est agrémentée d'une mezzanine pour permettre à l'animal de se déplacer dans un plus grand espace. Des enrichissements sont proposés aux animaux (balles type ping-pong). L'environnement (bruit, odeurs, lumière, température, hygrométrie) est contrôlé et maintenu stable au cours du temps.

Des points limites sont définis pour les étapes où cela semble nécessaire. L'expérimentation est arrêtée à chaque fois que les points limites sont atteints.

14805 La transgénèse additive est la méthode par laquelle un gène ou un fragment de gène est ajouté au génome d'un organisme vivant. La demande concerne la production de lapins génétiquement modifiés produits par addition de gènes permettant la production de protéines fluorescentes dans des cellules particulières de l'organisme. Ces protéines, naturellement produites par des organismes marins (méduses, coraux), n'ont aucun effet délétère. En revanche, leur fluorescence permet de repérer facilement dans l'animal les cellules qui les produisent soit dans les organes prélevés post mortem, soit chez l'animal vivant par des sondes spécifiques posées à la surface de l'organe.

Deux gènes seront ajoutés de façon indépendante dans des animaux distincts. Il est attendu que l'un de ces 2 gènes marque les cellules germinales de la gonade (futurs gamètes) et l'autre marque les cellules cibles de l'acide rétinolique (cellules jouant un rôle important mais encore mal connu dans la différenciation et la croissance de tout organe en développement). Des souris transgéniques

pour ces deux gènes ont déjà été produites par d'autres laboratoires, et n'ont présenté aucun symptôme délétère. Nous devons faire cette expérimentation chez le lapin, car la souris n'est pas un bon modèle pour l'étude des mécanismes de différenciation des gonades et des cellules sensibles à l'acide rétinoïque.

Chaque gène sera ajouté par injection d'ADN dans des embryons unicellulaires récupérés par lavage des voies génitales prélevées après abattage de femelles traitées par traitement de superovulation. 40 femelles "donneuses" seront ainsi mises à mort pour récupérer 600 embryons. Après injection, les embryons seront transférés dans les voies génitales de femelles "receveuses" traitées hormonalement pour développer une gestation. 40 femelles receveuses seront ainsi utilisées.

Dix à quinze jours après la naissance, les lapereaux seront génotypés; les animaux génétiquement modifiés seront conservés pour générer chacun une lignée par croisement avec d'autres lapins. Les animaux non génétiquement modifiés seront mis à mort rapidement.

Pour chaque lignée, des embryons et/ou du sperme seront congelés pour conserver la lignée.

Nous prendrons soin à utiliser le plus petit nombre d'animaux en suivant les procédures décrites ici :

- 1- Le traitement de superovulation des femelles permet d'augmenter le nombre d'embryons produits par femelle et donc de mettre à mort le moins de femelles "donneuses" possible.

- 2- Notre objectif est d'obtenir au moins 3 lapereaux génétiquement modifiés pour chaque gène injecté. Dès que ces trois lapereaux seront obtenus, la collecte d'embryons sera arrêtée et aucune femelle ne sera ni traitée hormonalement ni mise à mort ni opérée pour des transferts d'embryons.

- 3- Chaque femelle receveuse pourra recevoir 30 embryons par transfert, nombre classiquement adopté pour cet acte, qui permet d'utiliser peu de femelles tout en obtenant un bon taux de gestation.

Enfin, nous prendrons soin à effectuer les opérations chirurgicales de transfert embryonnaire en raffinant les procédures opératoires (anesthésie, analgésie, soins post opératoires). Le suivi de tous les animaux sera régulier pour détecter toute souffrance.

14806 La xénothérapie est un domaine d'avenir qui englobe toutes les thérapies à partir de tissus animaux, dévitalisés ou vivants ou de molécules d'origine animale. Les connaissances actuelles dans ce domaine ne permettent pas d'envisager la production de ces tissus par des méthodes "*in vitro*". La production par des animaux vivants est donc la seule méthode vraiment efficace.

Le projet a pour objectif la production d'une lignée de lapins qui pourraient être utilisés dans ce domaine. La modification génétique consiste à supprimer le fonctionnement d'un des gènes responsables de la présence de certaines molécules à la surface de toutes les cellules d'un individu. Ce gène n'est pas fonctionnel dans l'espèce humaine. Ainsi, l'invalidation du gène chez le lapin permettrait de supprimer la présence de ces molécules à la surface des cellules chez le lapin, et « d'humaniser » le lapin donnant ainsi la possibilité d'utiliser ces individus génétiquement modifiés dans les divers domaines de xénothérapie.

La production de lapins génétiquement modifiés sera effectuée par la technique de « gene editing ». Cela consiste à injecter dans l'embryon unicellulaire de lapin une nucléase qui cible une région choisie du génome et provoque l'introduction de mutations à l'origine de l'invalidation du fonctionnement du gène.

Le protocole comprend diverses étapes

- la saillie de lapines ayant reçu un traitement hormonal de superovulation,

- la récupération des embryons unicellulaires par euthanasie des lapines, et l'injection de l'enzyme de modification,

- leur transfert dans les voies génitales d'une lapine receveuse,

- l'élevage des petits après leur naissance, l'analyse de leur génotype et de leur phénotype,

- la reproduction des animaux de génotype intéressant pour obtenir au moins un lapin male chez lequel le gène a été invalidé.

Le protocole prévoit d'utiliser au maximum 80 animaux répartis sur les différentes étapes. A chaque étape du protocole, un objectif est fixé, ainsi que le nombre d'animaux nécessaires. Dès qu'un objectif est atteint, l'expérimentation sur les animaux s'arrête et le protocole passe à l'étape suivante.

Toutes les précautions sont prises pour utiliser les animaux dans des conditions telles que les souffrances éventuellement engendrées sont réduites au maximum. Des points limites sont définis pour les étapes où cela semble nécessaire. L'expérimentation est arrêtée à chaque fois que les points limites sont atteints.

14807 La coqueluche, maladie infectieuse respiratoire induite par la bactérie *Bordetella pertussis*, est encore aujourd'hui une cause importante de mortalité infantile et reste un réel problème de Santé Publique même dans les pays à forte couverture vaccinale. En 2014, le nombre de cas de coqueluche a été estimé à 24 millions à travers le monde. Au cours du développement d'un vaccin vivant atténué anti-pertussis (BPZE1) dans notre laboratoire, nous avons mis en évidence des propriétés anti-inflammatoires non spécifiques qui protègent contre la morbidité et la mortalité associées à l'inflammation induite par des infections virales ou bactériennes hétérologues ainsi que contre des maladies inflammatoires non-infectieuses, tel que l'asthme allergique. Au cours de notre projet, nous souhaitons comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans ces effets anti-inflammatoires protecteurs. Cette étude novatrice réunira des chercheurs reconnus internationalement dans les domaines de la microbiologie et du métabolisme. Les connaissances fondamentales acquises grâce à ce projet vont permettre d'ouvrir de nouvelles voies dans la prévention de l'inflammation chronique, le dénominateur commun de toutes les maladies liées à l'âge. Les résultats de ce projet pourraient donc à plus long terme déboucher sur le développement de nouvelles thérapies anti-inflammatoires favorisant une longévité en bonne santé. Concrètement, des études de la réponse immunitaire et de la protection contre la grippe (virus H3N2), la pneumonie (bactérie *Streptococcus pneumoniae*) et l'asthme allergique (induit par des acariens) vont être menées chez des souris. Il est indispensable de réaliser des études *in vivo* afin d'analyser les complexes effets immunitaires et métaboliques associés aux effets anti-inflammatoires du vaccin. Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires à l'origine des effets protecteurs de BPZE1, nous devons analyser plusieurs lignées de souris avec différents fonds génétiques BALB/c, C57BL/6 mais aussi des modèles de souris génétiquement modifiées (C57BL/6 IL-17 KO, CB17-SCID). Nous avons très à cœur de respecter la règle des 3R. Nous réduirons au maximum le nombre nécessaire de souris par groupe afin d'avoir suffisamment de puissance statistique. De plus, si cela devait se présenter en fonction du modèle de souris que nous serions amené à utiliser, nous serons extrêmement vigilants sur le respect de la notion de points limites (prostration, poil hérissé, mobilité dans la cage, difficulté respiratoire et perte de poids). Au vue de la procédure expérimentale, des différentes doses de vaccins et espèces de souris ainsi que des modèles d'inflammation à étudier, nous aurons besoin de 9600 souris au total pour le projet.

14808 Le Syndrome de Chudley McCullough (CMCS) est une maladie rare (1/1.000.000) qui se caractérise par une surdité sévère, précoce et complexe et des anomalies cérébrales structurelles comprenant, en outre, une hydrocéphalie. L'hydrocéphalie se caractérise par une accumulation anormale de liquide céphalorachidien (L.C.R) provoquant la dilatation des cavités du cerveau. Le pronostic des perturbations au niveau cérébral est encore confus du fait du faible nombre de patients recensés mais nous savons que le CMCS semble être la conséquence de mutations génétique

Pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires associés au CMCS, l'étude chez l'animal est indispensable. Dans ce projet, nous souhaitons générer des souris mutantes pour les gènes impliqués dans cette pathologie. Ces gènes seront mutés uniquement dans une partie du cerveau et l'oreille interne. Ainsi, la lignée de souris produite ne devrait pas présenter de phénotype dommageable. Néanmoins, si un phénotype dommageable est observé chez les animaux, le projet sera abandonné. Des animaux seront mis en reproduction et maintenu sur 5 ans.

Règle des 3R. Remplacer Ce projet s'intègre dans un projet plus global combinant différents travaux de recherche complémentaires allant de l'étude biochimique ou bio moléculaire au comportement.

Beaucoup d'études « in-vitro » sont donc effectuées en amont de l'utilisation de lignées d'animaux pour limiter au maximum leur utilisation.

Raffiner Pour supprimer l'angoisse ou la détresse des animaux au cours de la procédure, les animaux sont élevés en cage collective enrichie. Une inspection systématique et quotidienne du phénotype des premiers nouveaux nés sera mise en place pour détecter tout phénotype dommageable poche de lait bien remplie, développement moteur normal, croissance normale est réalisé par le zootechnicien. Toute anomalie sera répertoriée dans un fichier via l'outil informatique de gestion des lignées par le zootechnicien qui en informe directement l'expérimentateur. Des critères d'arrêt de procédure suffisamment précoces ont été mis en place pour anticiper toute douleur des animaux.

Réduire Pour limiter au maximum le nombre d'animaux, un minimum de 3 trio de souris (1 mâles et 2 femelles par cage) seront utilisés pour produire la génération de souris désirée. Nous avons estimé le nombre total d'animaux nécessaire à la création d'une seule lignée de souris transgénique est de 129 souris plus 120 souris pour maintenir la lignée soit 249 souris sur 5 ans.

14809 La neurogenèse est définie par l'ensemble des processus aboutissant à la formation de nouveaux neurones fonctionnels. Chez l'adulte, elle s'effectue au sein d'un environnement régulateur aussi appelé niche neurogénique. Différentes niches neurogéniques ont été découvertes et documentées dans le cerveau adulte, notamment dans l'hypothalamus, une structure cérébrale impliquée dans la régulation de différentes fonctions physiologiques dont la reproduction. Parmi les différents constituants présents au sein de la niche hypothalamique, le réseau vasculaire se distingue par une morphologie particulière. Contrairement au reste du cerveau, les vaisseaux sanguins qui alimentent cette région sont poreux, ce qui laisse suggérer un possible rôle régulateur de molécules véhiculées par le sang sur la neurogenèse. Récemment, des observations faites sur d'autres niches neurogéniques du cerveau ont montré la que la neurogenèse est associée à une angiogenèse, un processus de formation de nouveaux vaisseau sanguins. On parle alors de niche vasculaire pour caractériser ce phénomène. Avec ce projet, nous souhaitons savoir si, de la même manière que pour les autres niches neurogéniques du cerveau, une niche vasculaire est présente au sein de l'hypothalamus. Nous voulons également en caractériser les constituants et étudier les mécanismes de régulation. Afin d'observer la double présence d'une angiogenèse et d'une neurogenèse dans notre zone d'intérêt, un marqueur de cellules en division, la bromodésoxyuridine (BrdU), sera utilisé sur des souris. La quantification de la prolifération sera couplée à l'utilisation de marqueurs de la neurogenèse et du réseau vasculaire et permettra de mettre en évidence la prolifération des cellules souches, à l'origine des processus de neurogenèse et des cellules constituant la paroi des vaisseaux sanguins. Des études de survie réalisées 3 à 4 semaines après l'administration de marqueur de prolifération, permettront d'identifier la nature des cellules nouvellement formées.

Pour ces expériences 3 groupes de 10 souris adultes mâles seront nécessaires soit un total de 30 souris adultes mâles. Un premier groupe de souris permettra de réaliser des essais pour d'une part entraîner un opérateur et d'autre part, constituer une banque de coupes de cerveau pour des colorations de tissus, un même animal pouvant fournir environ 30 coupes fines de 25 µm dans l'hypothalamus, ces expériences seront réalisées sur dix animaux. Deux groupes de 10 animaux chacun seront dédiés à l'objectif principal de l'étude. L'administration de BrdU permettra de quantifier la prolifération (un premier groupe de 10 animaux) et d'étudier la survie cellulaire (un second groupe de 10 animaux) par des expériences en immunohistochimie. L'analyses complémentaire des autres zones du cerveau pour chaque animal permettra de comparer les taux de prolifération et la survie entre les différentes niches neurogéniques

Dans cette expérience, la règle des 3 R sera respectée.

Remplacer Il n'existe pas d'alternative à l'étude de la distribution de ces cellules prolifératives autrement que par une cartographie post-mortem.

Réduire le nombre d'animaux par groupe pour réaliser l'analyse statistique est de 10, plusieurs échantillons (coupes) de chaque animal seront exploités. Le nombre d'animaux par groupe

permettra de réaliser une analyse de variance pour comparer les taux de prolifération en fonction des niches.

Raffiner Pendant la durée de l'expérience, tous les animaux seront placés dans un environnement enrichi. Aucune souffrance n'a été rapportée suite à l'administration du BrdU aux doses qui seront utilisées.

14810 Le syndrome dysgénésique et respiratoire porcin (SDRP) est une affection virale caractérisée par des troubles de la reproduction chez les truies et des troubles respiratoires chez les animaux en croissance. Cette maladie est très présente dans les régions à forte densité de production porcine où elle conduit à des pertes économiques considérables.

Parmi les mesures de lutte contre le virus du SDRP (SDRPV), la vaccination est une des plus souvent mises en œuvre sur le terrain. Les vaccins qui sont les plus utilisés et les plus efficaces sont les vaccins vivants atténués (en anglais modified live vaccine MLV). Les MLV présentent cependant des défauts d'innocuité dans la mesure où, suite à des phénomènes de mutation ou de recombinaison, ils peuvent retrouver leur virulence.

En juillet 2019, une souche recombinante entre 2 vaccins MLV SDRP (dénommée souche Horsens) a été identifiée au Danemark. Cette souche a contaminé un centre d'insémination artificielle (CIA). A travers la semence, elle s'est ensuite répandue dans une quarantaine d'élevages où elle a induit des symptômes parfois sévères du SDRP.

L'objectif du présent projet est de caractériser la virulence de la souche Horsens et d'évaluer l'efficacité de 3 vaccins MLV SDRP pour son contrôle. Pour ce faire, nous mettrons en place une étude incluant 36 porcelets répartis en 6 groupes de 6 animaux chacun. La virulence de la souche Horsens et l'efficacité des vaccins seront évalués en mesurant des paramètres zootechniques, cliniques et virologiques dans les différents groupes.

Dans la mesure où l'infection par le virus du SDRP est spécifique aux suidés et qu'il n'y a pas possibilité d'évaluer l'efficacité vaccinale *in vitro*, il n'y a aucune possibilité de remplacement du modèle porc pour cette étude. L'infection des porcs par la souche Horsens devrait induire au plus une fièvre légère pendant quelques jours accompagnée d'une baisse de consommation alimentaire et de croissance.

Le nombre d'animaux a été réduit autant que possible tout en permettant l'obtention de données fiables et exploitables. Les porcs seront élevés en groupe, bénéficieront d'un enrichissement social et auront à leur disposition des objets manipulables. Ils seront nourris et abreuvés à volonté. En cas d'atteinte de points limites préalablement définis, les porcs seront euthanasiés afin qu'ils ne souffrent pas.

Les connaissances générées dans le cadre de ce projet permettront de caractériser précisément la virulence de la souche Horsens et de déterminer l'efficacité des vaccins vis-à-vis de celle-ci. Ces données permettront de prendre les mesures les plus appropriées pour le contrôle de cette souche au Danemark ou dans d'autres pays où elle pourrait émerger.

14811 Les arythmies cardiaques proviennent d'un dysfonctionnement de la production ou de la conduction électrique au sein du muscle cardiaque et représentent un problème de santé publique majeur. En effet, selon leur gravité, elles ont pour conséquence un pronostic fonctionnel (palpitations, essoufflement...) ou un pronostic vital (mort subite, insuffisance cardiaque...). Lorsque le pronostic vital du patient est engagé, il est nécessaire de traiter le patient grâce à une ablation par radiofréquence, à l'aide d'un cathéter. Le traitement consiste alors à isoler électriquement les cellules cardiaques responsables du déclenchement de l'arythmie par ablation thermique.

Afin de repérer précisément la zone de la paroi cardiaque à traiter au cours de l'intervention, le chirurgien réalise une cartographie de l'activité électrique cardiaque. Or, cette méthode souffre de nombreuses limitations puisqu'elle est invasive, coûteuse en temps et peu précise. En effet, la majeure partie de l'intervention sera consacrée au repérage de la zone à traiter à l'aide d'une cartographie par cathéter, parfois nécessitant jusqu'à plusieurs heures. En outre, la cartographie n'est réalisée qu'en surface du muscle cardiaque, tandis que la zone déclenchant l'arythmie peut

être située en profondeur de la paroi cardiaque. Ce manque d'informations au sein de la paroi cardiaque est en partie responsable du taux important de récurrence après traitement de l'arythmie. De plus, la durée importante de cette cartographie limite le temps consacré au traitement durant l'intervention.

Les ultrasons ultra-rapides représentent aujourd'hui une alternative prometteuse pour repérer une zone cardiaque responsable d'un déclenchement arythmique, en vue d'un traitement par radiofréquence. En effet, il est possible de réaliser une imagerie de l'onde électromécanique cardiaque (EWI) dans toute l'épaisseur de la paroi de façon mini- voire non-invasive. Cette méthode d'imagerie permet ainsi d'obtenir en quelques minutes une cartographie de l'activité cardiaque. Des essais préliminaires prometteurs ont pu être réalisés sur un modèle de cœur perfusé travaillant ex-vivo.

L'étude que nous souhaitons mener a pour but d'utiliser la méthode d'imagerie EWI sur une sonde d'imagerie ultrasonore basse résolution, toujours en vue de guider un traitement par ablation thermique (radiofréquence ou ultrasons focalisés). Ses caractéristiques techniques sont celles d'une sonde d'échocardiographie clinique.

Les objectifs de ce projet consistent à

- Assurer la faisabilité et la répétabilité de la cartographie de l'activité cardiaque par EWI à l'aide d'une sonde basse résolution.
- Assurer la faisabilité de contrôler le traitement par ablation thermique par EWI à l'aide cette même sonde.

Ce projet de recherche translationnelle d'une durée maximale de 2 ans mettra en œuvre un maximum de 7 porcs au cours de deux procédures. Un modèle simplifié d'arythmie a été retenu qui consiste à effectuer une thoracotomie sur animal anesthésié pour positionner des électrodes sur la paroi cardiaque externe. A l'issue de l'acquisition des mesures ultrasonores, l'animal sera mis à mort.

Conformité avec les 3R

Réduction 2 animaux serviront à la validation du modèle lors de la première procédure, permettant de valider le passage à la seconde procédure. Si celle-ci est vérifiée, les résultats obtenus pourront s'intégrer à la seconde procédure. De plus, il est possible de réaliser plusieurs dizaines d'acquisitions sur un seul animal. Les deux objectifs peuvent être réalisés au sein d'une même procédure afin de diminuer le nombre d'animaux utilisés.

Raffinement Le protocole d'anesthésie a été mis au point afin d'éviter toute souffrance. Le positionnement des électrodes de stimulation, la manipulation de la sonde ultrasonore ainsi que l'ablation par radiofréquence ou ultrasons focalisés seront réalisées par des manipulateurs expérimentés.

Remplacement Cette étude a débuté avec des travaux réalisés ex-vivo afin de valider la technique ce qui a permis de repousser le passage à l'animal. Afin d'envisager une translation en clinique, des essais précliniques sont alors nécessaires.

14812 Ce projet s'inscrit dans le cadre du développement d'un vaccin universel contre la grippe à base d'ARN auto-répliatif par un partenaire de notre laboratoire.

Les ARN auto-répliatifs, plus communément désignés réplicons, sont des acides nucléiques recombinants dérivés des virus à ARN qui détournent le mécanisme de répliation de ces virus pour produire des antigènes en grande quantité. Comme les virus à ARN, les réplicons sont capables de s'auto-amplifier ce qui permet une forte expression de l'antigène d'intérêt après administration d'une faible quantité d'acide nucléique. Cependant, contrairement au virus, les réplicons ne possèdent pas de gènes de virulence ce qui abolit leur capacité d'infecter. Avant de pouvoir passer aux essais cliniques chez l'Homme il faut déterminer la recette de vaccin la plus efficace sur un modèle animal.

L'étude qui fait l'objet de cette demande d'autorisation a pour but de vérifier si des combinaisons de molécules développées en laboratoire et injectées dans des souris sont capables d'expression chez la souris dans les tissus lymphoïdes (rate ou ganglion) et musculaires.

Des études sur cellules isolées ont permis de sélectionner une molécule mimant le virus grippal pouvant être combinée avec 3 transporteurs chimiques différents, chacun donnant des résultats encourageants.

Au lieu de tester la capacité de ces 3 formulations à protéger des souris contre une infection par le virus Influenza, expériences qui nécessitent des lots d'animaux importants et pouvant entraîner une souffrance liée à l'infection, notre travail dans le projet consistera à sélectionner par imagerie non-invasive la formulation permettant la plus forte expression du gène d'intérêt *in vivo* et seule celle-ci sera utilisée en vaccination. Nous allons comparer à la fois les formulations et les modes d'injection avec des ARN codant un gène rapporteur faiblement immunogène (la luciférase) avec des lots à petits effectifs (n=3) et sur des temps courts inférieurs à 72h. L'expression du transgène dans l'animal entier sera déterminée par imagerie de bioluminescence, non-invasive et le couple formulation / voie d'injection permettant la plus forte expression de la luciférase *in vivo* sera retenu pour une deuxième étape d'évaluation thérapeutique. Nous prévoyons dans cet objectif de mettre en oeuvre 96 animaux.

Cette approche en deux étapes permet d'exposer un nombre limité d'animaux (Réduire) à des souffrances liées à l'infection par Influenza (Raffiner). De plus les animaux sont anesthésiés durant les différents actes d'imagerie. Des points limites prédictifs ont été mis en place de sorte à limiter toutes douleurs. Il n'existe pas à l'heure actuelle de modèles permettant de remplacer les animaux mis en oeuvre. Notre stratégie s'inscrit donc dans prise en compte de la règle des 3R. Les études seront réalisées sur l'animal sain et il n'y a pas de dommages attendus chez l'animal. De plus

14813 En élevage, la radio est utilisée pour limiter le stress des animaux. Les objectifs sont divers : habituer les animaux à une ambiance sonore, limiter le stress, ou enrichir le milieu de vie. Alors que l'usage rapporte un effet bénéfique de la radio, très peu d'études décrivent les effets de la radio sur le bien-être des animaux. Dans ce projet, nous proposons d'évaluer les effets d'une exposition à la radio sur des agneaux élevés en allaitement artificiel, contexte d'élevage qui altère leur développement socio-émotionnel. Notre hypothèse est que l'exposition quotidienne à la radio va améliorer le bien-être d'agneaux allaités artificiellement.

Pour tester notre hypothèse, 44 agneaux (50% femelle) de race Ile de France seront élevés en groupe, en allaitement artificiel. A partir de l'âge d'une semaine et jusqu'à l'âge de 11-12 semaines, la moitié sera exposée à la radio 4 à 6 h par jour alors que l'autre moitié sera exposée au même contexte d'élevage sans la radio. Sur toute cette période d'élevage, le bien-être sera évalué par des indices comportementaux (maintenance, activité globale, réseau social), des profils hormonaux (cortisol, ocytocine) et des réponses émotionnelles à des situations potentiellement stressantes (interventions humaines, sevrage). A la fin de la période d'élevage, l'impact de l'exposition à la radio sera évalué au niveau cérébral, par imagerie par résonance magnétique (IRM) avec l'examen des connectivités anatomiques et fonctionnelles associées aux émotions (bien-être) et à l'audition (sensorialité stimulée). L'effet de l'enrichissement sera aussi testé à la fin de la période d'élevage par des tests de réactivité émotionnelle et de séparation sociale.

Pour chacune des procédures, nous nous efforçons de répondre à la règle des 3R.

Remplacement : Cette étude vise à tester l'impact de l'enrichissement sonore sur le bien-être d'agneaux élevés en allaitement artificiel. Elle ne peut être menée que sur l'agneaux vivant et aucune méthode de remplacement comme une étude *in vitro* n'est envisageable.

Réduction : Nous avons choisi un effectif de 44 agneaux élevés en 4 groupes de 11 selon l'enrichissement sonore (radio ou non) et leur genre (mâles ou femelles). Cet effectif est nécessaire pour être en capacité d'étudier les réseaux sociaux ou plus généralement les comportements, un effectif plus petit serait une limite. Cet effectif a été suffisant dans d'autres projets pour mettre en évidence des effets de l'expérience précoce sur des paramètres comportementaux, endocriniens et d'imagerie.

Raffinement : Environnement d'élevage tous les agneaux seront nourris ad libitum avec un distributeur automatique de lait. L'environnement d'élevage répond aux besoins d'enrichissement social (agneaux élevés par groupe de 11 individus de même genre) et d'enrichissement exploratoire

(paille et objets tels que des cônes de chantier ou cavaletti). Pour les groupes expérimentaux, l'exposition à la radio sera ponctuelle (4 à 6 h par jour), à un volume sonore équivalent au volume sonore "ambiance vivante" (45-75 dB), ce qui ne devrait pas générer de stress. Ces différentes conditions d'élevage limitent le mal-être des animaux élevés en allaitement artificiel.

Prises de sang : Elles seront réalisées deux fois par semaine tout au long de l'expérience. Les prises de sang seront réalisées par les deux mêmes personnes expérimentées et aux mêmes heures de la journée. Toutes les manipulations seront réalisées dans l'environnement d'élevage afin de préserver l'environnement social. Cette constance devrait permettre à l'animal de s'habituer à la procédure et de limiter le stress. Après la prise de sang, la zone de piqûre sera massée avant que l'agneau soit relâché dans le groupe. A l'occasion de cette procédure, une pesée hebdomadaire sera réalisée ce qui limitera le nombre d'interventions de l'être humain.

Anesthésie et Acquisition IRM Cette procédure étant réalisée à distance du lieu d'élevage (moins de 500m), les agneaux seront transportés par 4 pour limiter le stress. A leur arrivée, ils seront placés dans des boxes paillés. Pour limiter la douleur lors de l'anesthésie, la taille de la sonde trachéale sera adaptée à la taille de l'animal et sera enduite d'une pommade anesthésiante (xylocaïne visqueuse 2%). Lors de l'acquisition IRM, les agneaux seront équipés de casque sur les oreilles pour limiter l'exposition au bruit de la machine et les exposer à des sons particuliers pendant l'acquisition. Les animaux seront emmaillotés dans un linge en tissu pour éviter un contact direct avec la table d'acquisition et assurer un meilleur confort. Pendant toute la durée d'anesthésie, le rythme cardiaque et la pression artérielle seront suivis grâce à un capteur placé sur la patte. En cas de détresse cardiaque ou respiratoire, l'acquisition sera stoppée et l'animal réveillé. Lors de la phase de réveil, les animaux seront replacés avec leurs congénères familiers et surveillés jusqu'à leur réveil complet avant de retourner dans leur environnement d'élevage en fin de journée. Cette procédure fait l'objet de ce document de saisine.

Tests comportementaux ces tests permettront d'évaluer la réactivité des agneaux soumis à des situations potentiellement stressantes : environnement nouveau, présence d'un être humain passif, séparation visuelle d'avec les congénères. Pour évaluer l'effet apaisant de la radio, la dernière phase du test consistera à diffuser la radio alors que l'animal est toujours séparé visuellement de ses congénères. Afin de limiter tout stress supplémentaire induit par l'ensemble des manipulations inhérentes à ces tests comportementaux, nous avons choisi les durées les plus courtes possibles (5min), une salle de test voisine des salles d'élevage et de maintenir les agneaux avec des congénères en dehors des périodes d'isolement social.

Les procédures relatives aux prélèvements de sang et aux tests comportementaux font l'objet d'un document de saisine associé EU1/2.

A la fin du projet, tous les animaux seront rendus à l'unité expérimental.

14814 Les artères de résistance sont les petits vaisseaux sanguins situés en amont des capillaires. Ils sont cruciaux pour la perfusion sanguine des organes vitaux avec un contrôle fin du débit et de la pression. Les vaisseaux sont soumis à des forces hémodynamiques induites par le flux sanguin. Les perturbations de flux ont un impact significatif sur la cellule endothéliale de part sa fonction et sa localisation. Le mouvement et la répartition des mitochondries nommés "dynamique mitochondriale" permet à la cellule de s'adapter en réponse à des contraintes physiologiques de son environnement. Cette dynamique correspond à un équilibre entre le niveau de fusion et de fission des mitochondries. Nous nous intéressons à l'implication la protéine de fusion OPA-1 dans la réponse endothélium dépendante des vaisseaux. Etant donné le rôle central de la cellule endothéliale dans ces mécanismes, un modèle inductible endothélial sera utilisé. Après avoir vérifié le rôle physiologique d'OPA-1 dans la fonction endothéliale vasculaire, il est important d'étudier son rôle dans des modèles physiopathologiques tels que l'hypertension artérielle chronique, la maladie rénale chronique (MRC), le diabète ou encore des modèles ischémiques. Grâce à ces études nous déterminerons ainsi la place potentielle d'une modulation d'OPA-1 au niveau endothélial afin de corriger la dysfonction artérielle et les perturbations des débits sanguins locaux particulièrement

perturbés dans les modèles physiopathologiques que sont la MRC, l'hypertension artérielle chronique, le diabète.

Ce projet nécessitera l'utilisation de 840 animaux au maximum.

Nous appliquons la règle des 3 R nous ne pouvons pas remplacer ce modèle par un modèle *in vitro*, car les modèles physiopathologiques par définition étudient les conséquences pathologiques de la délétion sur l'ensemble de l'organisme. Les lignées cellulaires ne peuvent reproduire les mécanismes complexes d'adaptation des vaisseaux.

Tous les animaux du projet seront injectés au tamoxifène 150mg/kg/j pendant 5 jours, diluée dans une huile de maïs neutre non irritante. Les injections en IP sont faites par le même expérimentateur. Une alternance de côté sera respectée et un massage du site sera réalisé après chaque injection. La solution est placée sur un tapis chauffant avant et pendant l'injection.

Pour les groupes A B et C nous procéderons à un examen clinique, si l'apparence générale de l'animal est anormale ou si des signes cliniques au niveau de la respiration, du poids ou une anomalie dans la coloration des muqueuses sont présents, les animaux seront exclus du protocole avant la chirurgie. La douleur de l'animal est évaluée au réveil, puis quotidiennement jusqu'au sacrifice, cf annexe 2

Les instruments sont préalablement stérilisés par stérilisateur à billes à chaud. Les animaux seront anesthésiés sous isoflurane 5% puis maintien à 2% et maintenus à 37°C par un tapis chauffant. Lors des différentes interventions, un champ opératoire sera utilisé. Une injection de buprénorphine 2 mg/kg sera effectuée en sous-cutané. Les modifications de rythme cardiaque et respiratoire seront observées. La réponse nociceptive des animaux sera testée en cours d'intervention (pincement de la patte arrière). Les animaux seront mis dans une cage propre et dans une couveuse jusqu'au réveil. La surveillance des animaux, en concertation avec la SBEA, sera réalisée de façon continue jusqu'au réveil.

La procédure de réveil sera réalisée pour les procédures chirurgicales les animaux seront surveillés toutes les heures pendant les 4 premières heures puis quotidiennement.

Concernant le groupe D le traitement n'entraîne pas de souffrance animale. Les animaux seront surveillés quotidiennement par le personnel de l'animalerie nous réduisons au minimum le nombre d'animaux pour obtenir des résultats exploitables au niveau statistique. Nous utiliserons le test de student et des tests d'Anova deux voies avec post-test de Bonferroni. nous raffinons nos conditions d'expérimentation et d'hébergement pour le bien-être de nos animaux avec le soutien de la structure de bien-être animal (SBEA). Les animaux sont hébergés dans des cages aux normes (au minimum par 2 et au maximum par 5) suivant l'âge et le poids des animaux et les cages sont enrichies par des jouets (copeaux, cabanes, sopalin). Nous raffinons nos expérimentations en utilisant les animaux de chaque groupe pour recueillir plusieurs types de données. Sur chaque animal l'ensemble des organes et tissus pouvant être recueillis sont prélevés afin d'anticiper les expérimentations futures

14815 L'immunomodulation est le système de régulation qui permet d'activer ou d'inhiber le système immunitaire. Les cellules tumorales ont tiré profit de ce système de régulation en exprimant des molécules d'immunomodulation inhibitrices. Les cellules immunitaires au contact de ces protéines exprimées par les cellules tumorales vont alors devenir inactives et ne pourront plus détruire la tumeur.

Depuis le début des années 2000, un nouveau type de traitement contre le cancer, l'immunothérapie, à vue le jour. Ce traitement a pour but de réactiver le système immunitaire du patient lui permettant d'éliminer la tumeur par l'action des cellules effectrices cytotoxiques (cellules tueuses). Le but de ce projet est de tester de nouvelles cibles qui pourraient permettre de réactiver le système immunitaire dans une tumeur où ce type de traitement n'est pas efficace à l'heure actuelle.

Le cancer du pancréas est l'un des cancers les plus agressif avec un taux de survie de 5%, 5 ans après le diagnostic de la maladie. Malgré des résultats très enthousiasmant dans d'autres cancer, l'immunothérapie basée sur le blocage des molécules d'immunomodulation inhibitrices ne semble

pas efficace dans le cadre du cancer du pancréas. Une hypothèse expliquant cette faible efficacité serait que pour cette pathologie, les cellules tumorales pourraient être capable de bloquer le système immunitaire par des molécules régulatrices encore inconnues. La découverte de nouvelle cible à bloquer par immunothérapie est donc nécessaire pour réactiver le système immunitaire des patients.

Ce projet d'une durée d'un an, a pour but de tester et valider le rôle de 2 molécules qui semblent être impliquées dans le blocage du système immunitaire dans le cancer du pancréas. Après une phase préliminaire de caractérisation de ces molécules *in vitro* que nous venons de mener, nous voudrions tester l'impact de la délétion de ces molécules sur la croissance / la biologie tumorale. Pour ceci, nous voudrions mettre en place initialement une seule procédure pour ce projet. Cette procédure consisterait à injecter des cellules tumorales humaines, dérivées de cancer du pancréas et délétées de nos gènes d'intérêt, chez des souris. Nous estimons à 20 lots de 5 souris soit 100 souris immunodéficientes Balb/c Nude injectées en sous cutanée avec des cellules tumorales sans modification (Wild Type WT) ou délétées pour nos gènes d'intérêt. En effet nous allons injecter plusieurs lignées KO pour nos gènes d'intérêt et 5 animaux par lot devraient nous permettre de voir une différence statistique (grâce à un test non paramétrique) si ces gènes ont un impact sur la croissance tumorale. En comparant la pousse de ces tumeurs (mesuré sous la peau grâce à un pied à coulisse) nous pourrions alors vérifier si la délétion de ces gènes, en plus d'un rôle probable sur le système immunitaire, pourrait avoir un effet directement sur la croissance tumorale.

Au cours de cette procédure, aucun prélèvement ne sera effectué sur animaux vivants. Cette étude sera menée en respectant les règles des 3R afin de réduire, raffiner et remplacer le plus souvent possible l'utilisation des souris. La tumeur prélevée post-mortem sera fixée et congelée pour former une banque qui permettra de réutiliser ces échantillons au cours de futures expériences sans avoir besoin de régénérer des animaux. Pour réduire au maximum le nombre d'animaux nous utiliserons 5 souris par lot pour pouvoir observer une différence statistique si elle existe. Notre protocole est peu invasif et ne devrait pas générer de douleur. Cependant si l'état de la souris nécessite une prise d'antalgique, nous lui donnerons de la buprenorphine à 0.1mg/Kg. Notre animalerie permet de mettre en place des conditions d'élevage optimisées pour réduire le stress des animaux au minimum (5 animaux maximum par cage de 52x30x20cm) couplé à un système d'enrichissement dans les cages (diamond twist).

14816 Contexte Les plaquettes sanguines jouent un rôle fondamental dans les processus d'hémostase. C'est ce qui nous permet d'éviter les hémorragies en cas de blessures ou de lésions. Quand le taux de plaquettes circulantes chute en dessous de 30.000 plaquettes par μL de sang chez un patient, le risque d'hémorragie interne devient important et une transfusion peut être envisagée. Une complication post transfusionnelle connue est la production d'anticorps anti-plaquettes par le receveur dirigés contre les plaquettes du donneur, on parle alors d'allo-immunisation. Ainsi, si le receveur développe de tels anticorps de nouvelles transfusions seront inefficaces sur un plan thérapeutique puisque les plaquettes du donneur seront détruites par ces anticorps on dit alors que le patient est en état réfractaire. Cette problématique est particulièrement importante chez des patients dont les pathologies nécessitent des transfusions plaquettaires récurrentes.

Objectif Définir les cellules à l'origine de la production d'anticorps anti-plaquettes permettrait d'agir en amont de la transfusion et d'éviter la production de tels anticorps. Des études préliminaires au laboratoire ont permis de suggérer l'implication de certaines sous population de cellules de la rate. Ce projet nous permettra de confirmer ou non le rôle de ces cellules *in vivo* dans la production d'anticorps anti-plaquettes suite à une transfusion. In fine, cibler une population cellulaire spécifiquement avant la transfusion de plaquettes permettrait d'empêcher ces complications post-transfusionnelles.

Méthodologie La compréhension de tels mécanismes nécessite la mise en place d'un modèle animal d'allo-immunisation afin de pouvoir prélever, après la transfusion, différents échantillons (organes, sang,..) et analyser la production d'allo-anticorps. Ce modèle repose sur la différence entre des molécules propres à chaque individu, qu'on peut retrouver entre le donneur et le receveur et nous permettra de modéliser le phénomène d'allo-immunisation. Nous étudierons notamment avec

précision quel sous type de cellules du receveur initie la réponse immune contre les plaquettes transfusées.

Réduire Les nombres d'animaux utilisés lors des expériences seront minimalisés, avec la contrainte d'obtenir des observations suffisamment représentatives. Des expériences préliminaires au laboratoire nous ont permis de fixer à 5 le nombre de souris par conditions testées, ce chiffre tient compte de la variabilité de la réponse immune inter individus.

Remplacer Les événements initiaux conduisant à la production d'anticorps anti-plaquettes ne peuvent pas être étudiés chez des patients transfusés. Des modèles animaux sont nécessaires afin de pouvoir prélever après la transfusion, différents échantillons pour étudier la prise en charge des plaquettes transfusées et les mécanismes immuns qui en découlent.

Raffiner : Un soin particulier sera apporté afin de diminuer le stress et la douleur de tous les animaux utilisés dans ce projet

- Les animaux sont mis entre 2 et 6 par cage afin de concilier leurs besoins sociaux et la réduction de la fréquence des changes avec le stress y afférant.
- Hébergement dans des cages munies de particules de bois et enrichie avec un carré en coton compressé afin de permettre aux animaux de réaliser un nid conformément à leurs besoins comportementaux (carrés de coton+frisures papier)
- Accès permanent à l'eau de boisson et à la nourriture
- Anesthésie de l'animal afin de limiter l'angoisse, l'inconfort, le stress et la douleur associés.
- Injection d'analgésique le cas échéant.
- Mise en place d'une fiche de suivi pour suivre l'état des animaux et veiller à leur bien-être tout au long de l'expérimentation.

Pendant toutes les expérimentations, les animaux sont surveillés par du personnel entraîné

Ce projet nécessitera au maximum 180 souris.

14817 *Coxiella burnetii* est une bactérie intracellulaire stricte responsable d'une zoonose nommée fièvre Q dont la voie d'infection est aérienne. Dans la plupart des cas sans suite, des rechutes de la fièvre Q ont été rapportées après la primo-infection, notamment chez les personnes immunodéprimées, enceintes ou lors de traitement médical tel que les rayons X ou à la cortisone.

Plusieurs évidences soulignent un tropisme pour cette bactérie pour les annexes foétales et le placenta au cours de la grossesse. En effet, l'infection par *C. burnetii* est associée à des complications obstétricales incluant des avortements, des accouchements précoces ainsi que la mort du fœtus in utero. Ces évidences sont rapportées d'observations cliniques chez l'homme et l'animal d'élevage. De plus, *C. burnetii* a été retrouvée au sein du tissu placentaire dont de nombreux isolats cliniques ont pu être extrait du placenta de femmes et femelles infectées. *In vitro*, notre équipe mais également d'autres groupes ont pu montrer que les cellules placentaires, incluant les trophoblastes et les cellules immunes placentaires jouaient un rôle déterminant dans la persistance de l'infection et une dysfonction de la réponse immune locale. L'état de l'art et nos précédentes expériences suggèrent que la modulation de la réponse de l'hôte au cours de la gestation joue un rôle déterminant dans les complications obstétricales au niveau de la mère et du fœtus. Cependant, à ce jour, aucune étude n'a pu identifier les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'infection par *C. burnetii* et la survenue de complications obstétricales.

Ce projet a pour but de mieux comprendre la physiopathologie de l'infection à *C. burnetii* au cours de la gestation dans un modèle de souris gestantes infectées par voie aérienne.

L'expérimentation animale est incontournable car aucune étude *in vitro* ne peut permettre d'étudier le lien entre infection/gestation dans des conditions physiopathologiques incluant les multiples paramètres présentant au cours de la grossesse.

Pour réaliser notre projet, nous utiliserons le modèle de souris BALB/c sauvage gestantes qui seront infectées par différentes souches de *C. burnetii* par voie aérienne. Les souches bactériennes

incluent une souche d'origine placentaire (isolats cliniques N°122) et la souche de référence nine mile 1 (NMI).

Dans un premier temps, nous étudierons la spécificité de l'infection par la souche placentaire de *C. burnetii* chez les souris gestantes infectées par comparaison aux souris contrôles (gestantes non infectées). Nous nous intéresserons à la charge bactérienne et l'aspect histologique au niveau de différents tissus issus des mères et des fœtus (foie, poumon, rate, cœur, cerveau, tissu adipeux, sang, placenta, liquide amniotique...).

Pour limiter le nombre d'animaux utilisés, dans un premier temps nous ne testerons que la souche placentaire. Si les résultats obtenus sont prometteurs nous réaliserons le reste du projet en utilisant une souche NMI, sinon le protocole sera arrêté. En outre, nous utiliserons le même groupe contrôle pour les deux souches de *C. burnetii* à tester.

Pour le confort de l'animal, un enrichissement sera mis en place à l'aide des dômes et du matériel pour nidification. Afin de maximiser les données obtenues de chaque animal, plusieurs tissus seront prélevés.

Ce projet sera réalisé dans une enceinte de sécurité microbiologique de classe 3 (NSB3) et il nécessitera au total 135 souris.

14818 La cachexie cancéreuse est un syndrome multifactoriel auquel est exposé la majorité des patients souffrant d'un cancer. Elle conduit à une perte massive de masse musculaire associée ou non à une perte de masse grasse. Cela affecte de façon importante la réponse aux traitements anti-cancéreux, la qualité de vie, l'autonomie et l'espérance de vie des patients. Il est donc indispensable d'identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans la cachexie cancéreuse pour élaborer des stratégies visant à améliorer le quotidien des malades et leur survie. Ainsi, notre premier objectif est d'identifier les mécanismes conduisant aux altérations musculaires dans un modèle murin de cancer du pancréas. L'activité physique, connue pour améliorer les fonctions musculaires pourrait contrecarrer ces altérations. Notre second objectif est donc d'évaluer l'impact de différents niveaux d'activité physique (AP) sur la cachexie cancéreuse. Pour se faire, 48 souris sont placées en cage individuelle agrémentée d'une roue d'activité, leur permettant de réaliser de l'AP volontaire, pendant 6 semaines. A la septième semaine, les animaux sont divisés en 2 groupes un groupe contrôle (n=24) et un groupe cancer (n=24). Seules les souris du groupe cancer sont soumises à une injection de cellules tumorales pancréatiques. Une semaine après l'injection, l'ensemble des animaux est réparti en quatre groupes 1 groupe contrôle inactif (n=12), 1 groupe contrôle actif (n=12), 1 groupe cancer inactif (n=12), 1 groupe cancer actif (n=12). Les animaux actifs, conservent l'accès à la roue d'activité tandis que les animaux inactifs n'y ont plus accès jusqu'à la fin du protocole.

Ce projet de recherche a été pensé en respectant au mieux la règle des 3R. Remplacement : ce modèle expérimental *in vivo* ne peut pas être remplacé par un modèle *in vitro* car il résulte d'un dialogue entre la tumeur, le sang et le muscle. Réduction : Le nombre d'animaux a été déterminé afin d'obtenir des valeurs statistiquement significatives et scientifiquement irréprochables pour valider les données obtenues à la fin de la procédure. Dans notre étude, 48 souris mâles seront utilisées pour répondre à ces exigences statistiques. Raffinement : les animaux seront hébergés dans une structure agréée qui tient compte de l'éthique animale. L'hébergement se fait dans des cages munies de jouets afin de minimiser le stress induit par l'hébergement. Le raffinement est complété par une surveillance journalière des animaux pour s'assurer que les conditions de bien-être sont respectées. En cas de souffrance constatée, toutes les mesures nécessaires pour réduire la souffrance seront mises en place (anesthésie, analgésie et/ou sortie du protocole).

14819 En élevage, la radio est utilisée pour limiter le stress des animaux. Les objectifs sont divers : habituer les animaux à une ambiance sonore, limiter le stress, ou enrichir le milieu de vie. Alors que l'usage rapporte un effet bénéfique de la radio, très peu d'études décrivent les effets de la radio sur le bien-être des animaux. Dans ce projet, nous proposons d'évaluer les effets d'une exposition à la radio sur des agneaux élevés en allaitement artificiel, contexte d'élevage qui altère leur développement

socio-émotionnel. Notre hypothèse est que l'exposition quotidienne à la radio va améliorer le bien-être d'agneaux allaités artificiellement.

Pour tester notre hypothèse, 44 agneaux (50% femelle) de race Ile de France seront élevés en groupe, en allaitement artificiel. A partir de l'âge d'une semaine et jusqu'à l'âge de 11-12 semaines, la moitié sera exposée à la radio 4 à 6 h par jour alors que l'autre moitié sera exposée au même contexte d'élevage sans la radio. Sur toute cette période d'élevage, le bien-être sera évalué par des indices comportementaux (maintenance, activité globale, réseau social), des profils hormonaux (cortisol, ocytocine) et des réponses émotionnelles à des situations potentiellement stressantes (interventions humaines, sevrage). A la fin de la période d'élevage, l'impact de l'exposition à la radio sera évalué au niveau cérébral, par imagerie par résonance magnétique (IRM) avec l'examen des connectivités anatomiques et fonctionnelles associées aux émotions (bien-être) et à l'audition (sensorialité stimulée). L'effet de l'enrichissement sera aussi testé à la fin de la période d'élevage par des tests de réactivité émotionnelle et de séparation sociale.

Pour chacune des procédures, nous nous efforçons de répondre à la règle des 3R.

Remplacement : Cette étude vise à tester l'impact de l'enrichissement sonore sur le bien-être d'agneaux élevés en allaitement artificiel. Elle ne peut être menée que sur l'agneaux vivant et aucune méthode de remplacement comme une étude *in vitro* n'est envisageable.

Réduction : Nous avons choisi un effectif de 44 agneaux élevés en 4 groupes de 11 selon l'enrichissement sonore (radio ou non) et leur genre (mâles ou femelles). Cet effectif est nécessaire pour être en capacité d'étudier les réseaux sociaux ou plus généralement les comportements, un effectif plus petit serait une limite. Cet effectif a été suffisant dans d'autres projets pour mettre en évidence des effets de l'expérience précoce sur des paramètres comportementaux, endocriniens et d'imagerie.

Raffinement : Environnement d'élevage : tous les agneaux seront nourris ad libitum avec un distributeur automatique de lait. L'environnement d'élevage répond aux besoins d'enrichissement social (agneaux élevés par groupe de 11 individus de même genre) et d'enrichissement exploratoire (paille et objets tels que des cônes de chantier ou cavaletti). Pour les groupes expérimentaux, l'exposition à la radio sera ponctuelle (4 à 6 h par jour), à un volume sonore équivalent au volume sonore "ambiance vivante" (45-75 dB), ce qui ne devrait pas générer de stress. Ces différentes conditions d'élevage limitent le mal-être des animaux élevés en allaitement artificiel.

Prises de sang Elles seront réalisées deux fois par semaine tout au long de l'expérience. Les prises de sang seront réalisées par les deux mêmes personnes expérimentées et aux mêmes heures de la journée. Toutes les manipulations seront réalisées dans l'environnement d'élevage afin de préserver l'environnement social. Cette constance devrait permettre à l'animal de s'habituer à la procédure et de limiter le stress. Après la prise de sang, la zone de piqûre sera massée avant que l'agneau soit relâché dans le groupe. A l'occasion de cette procédure, une pesée hebdomadaire sera réalisée ce qui limitera le nombre d'interventions de l'être humain.

Anesthésie et Acquisition IRM Cette procédure étant réalisée à distance du lieu d'élevage (moins de 500m), les agneaux seront transportés par 4 pour limiter le stress. A leur arrivée, ils seront placés dans des boxes paillés. Pour limiter la douleur lors de l'anesthésie, la taille de la sonde trachéale sera adaptée à la taille de l'animal et sera enduite d'une pommade anesthésiante (xylocaïne visqueuse 2%). Lors de l'acquisition IRM, les agneaux seront équipés de casque sur les oreilles pour limiter l'exposition au bruit de la machine et les exposer à des sons particuliers pendant l'acquisition. Les animaux seront emmaillotés dans un linge en tissu pour éviter un contact direct avec la table d'acquisition et assurer un meilleur confort. Pendant toute la durée d'anesthésie, le rythme cardiaque et la pression artérielle seront suivis grâce à un capteur placé sur la patte. En cas de détresse cardiaque ou respiratoire, l'acquisition sera stoppée et l'animal réveillé. Lors de la phase de réveil, les animaux seront replacés avec leurs congénères familiers et surveillés jusqu'à leur réveil complet avant de retourner dans leur environnement d'élevage en fin de journée. Cette procédure fera l'objet d'un document de saisine associé EU2/2.

Tests comportementaux : ces tests permettront d'évaluer la réactivité des agneaux soumis à des situations potentiellement stressantes : environnement nouveau, présence d'un être humain passif,

séparation visuelle d'avec les congénères. Pour évaluer l'effet apaisant de la radio, la dernière phase du test consistera à diffuser la radio alors que l'animal est toujours séparé visuellement de ses congénères. Afin de limiter tout stress supplémentaire induit par l'ensemble des manipulations inhérentes à ces tests comportementaux, nous avons choisi les durées les plus courtes possibles (5min), une salle de test voisine des salles d'élevage et de maintenir les agneaux avec des congénères en dehors des périodes d'isolement social.

A la fin du projet, tous les animaux seront rendus à l'unité expérimental.

14820 La grippe est une maladie infectieuse fréquente et contagieuse due à l'infection par le virus de la grippe. Souvent banalisée, la grippe représente un réel problème de santé publique à l'échelle mondiale puisqu'elle est responsable de 250 000 à 500 000 décès chaque année, essentiellement des jeunes enfants et des personnes âgées. En France, la grippe touche plusieurs millions d'individus chaque année. En période endémique, la prévention est basée sur l'hygiène, en particulier des mains. De nombreux traitements prophylactiques ou curatifs existent, cependant, tous ces moyens de prévention ne sont efficaces que lorsqu'ils sont utilisés tôt au cours de la maladie, et ils ne sont pas totalement protecteurs. C'est pourquoi la recherche de nouvelles molécules thérapeutiques est nécessaire. L'intérêt ici est de trouver une molécule qui serait plus efficace que celles déjà existantes.

Partie 1 du projet

Le virus de la grippe (Influenza A, souche H3N2) sera administré à un groupe d'animaux. Au pic de la maladie, soit 7 jours, le groupe malade et le groupe non malade seront mis à mort dans le but d'étudier et de comprendre le rôle de cytokines, récepteurs ou voies de signalisation impliquées dans l'infection virale dans un modèle *in vivo* d'infection par le virus de la grippe. Ces études vont nous permettre de mettre en évidence une partie du mécanisme d'induction de la maladie.

Partie 2 du projet

La phase pré clinique qui consiste à l'étude de l'action des agents pharmacologiques *in vivo* chez le rongeur est une étape essentielle dans le développement de médicaments à visée anti inflammatoire. Ce projet a pour but de tester de nouveaux médicaments antigrippaux. Les animaux infectés seront ensuite sacrifiés au bout de 7 ou 8 jours en respectant les règles de sécurité adéquats (travail sous poste de sécurité microbiologique PSM) pour analyser différents paramètres immunologiques et virologiques. Ceci permettra d'étudier l'efficacité des molécules testées sur le développement de la maladie (signes cliniques) et l'inflammation pulmonaire.

L'animal utilisé est la souris C57BL/6, BALB/c ou génétiquement modifiées ne présentant pas de phénotype dommageable. L'administration du virus à l'animal se fait par voie intra-nasale sous anesthésie générale afin de minimiser les situations douloureuses et stressantes. Ce modèle induit des douleurs inflammatoires aiguës à l'animal, liées au développement de la maladie pulmonaire. Lors de l'expérimentation le point limite critique observé est la prise alimentaire, afin de minimiser le mal-être des animaux, des croquettes humides sont mises au fond de la cage, si les animaux atteignent les points limites tels qu'un score total de 4 incluant un score de 2 dans l'un des critères observés (aspect, comportement/mobilité) et/ou une perte de poids supérieure à 20%, ils seront mis à mort. Les molécules thérapeutiques du sponsor étant testées à l'aveugle, ceci ne nous permet pas d'exclure une interaction probable avec les analgésiques. De plus aucune donnée scientifique n'existe actuellement permettant d'exclure l'effet de ces analgésiques sur la réponse immunitaire, paramètre majeure analysé dans nos expérimentations Une surveillance quotidienne des animaux y compris les week-ends est donc effectuée pendant la période d'acclimatation et d'expérimentation. Les conditions d'hébergement sont celles qui sont requises par l'annexe II de l'arrêté relatif à l'agrément des EU. Les animaux seront sacrifiés selon la réglementation en vigueur. Le projet représente un ensemble d'études types. Le nombre d'études réalisées durant la période de validité de l'autorisation dépendra du nombre de molécules à tester.

Le projet pourra comporter jusqu'à 20 études en recherche et 20 études pour la phase pré-clinique. Une étude comportera jusqu'à 80 animaux pour la recherche et 90 animaux pour la phase pré-clinique, soit 3400 animaux au total

A ce jour, l'animal de laboratoire reste le seul recours fiable et pertinent permettant de tester des nouvelles molécules thérapeutiques ciblant l'infection par le virus de la grippe. Ce projet sera réalisé en respectant les principes fondamentaux de l'expérimentation animale

Remplacement le modèle animal est fondamental dans notre cas, puisque l'étude de l'inflammation et de la pathologie ne peut se faire que sur un organisme vivant entier.

Raffinement les animaux sont observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être et d'éviter au maximum la douleur au moment de l'expérimentation grâce à l'utilisation d'une grille de score clinique. Les animaux montrant de sévère signe clinique (léthargie, respiration rapide) seront mis à mort.

Réduction le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement pertinents et reproductibles, évitant ainsi de refaire plusieurs fois les mêmes expérimentations.

14821 Ce projet s'inscrit dans un projet de recherche plus large qui porte sur l'étude des mécanismes moléculaire qui permette la transmission correcte du patrimoine génétique lors de la méiose, la division cellulaire conduisant à la formation des gamètes. Nos travaux récents ont permis d'identifier une nouvelle protéine nécessaire à la formation des gamètes, impliquées dans le contrôle du mécanisme de recombinaison homologue lors de la méiose. Nous souhaitons utiliser un anticorps dirigé contre cette protéine afin d'étudier précisément sa localisation dans les noyaux. Cet anticorps permettra par ailleurs de déterminer si cette protéine interagit avec d'autres facteurs impliqués dans la formation des gamètes et de mieux comprendre comment ce processus clé de l'hérédité est régulé.

Nécessité du recours à l'animal :

Ces études nécessitent le développement d'un ou plusieurs anticorps spécifiques qui permettront la détection de cette protéine dans les cellules germinales. A ce jour, il n'existe pas de tels anticorps, ni dans le commerce, ni dans le milieu de la recherche, d'où la nécessité de produire des anticorps spécifiques. A la différence de l'ADN et des protéines, à ce jour il n'existe pas de technologie qui permette de produire un anticorps synthétique à partir d'un antigène donné. D'où la nécessité de produire les anticorps chez des animaux, dans ce cas spécifique chez les lapins. Cette méthode est d'utilisation courante pour le développement d'anticorps chez les lapins dans la plupart des laboratoires de recherche en France et dans le monde. Le recours au lapin est peu coûteux, nécessite peu d'investissement humain et permet d'obtenir rapidement une bonne quantité de sérum qui sera largement suffisante pour toutes les études décrites au paragraphe précédent. Afin de réduire au minimum le nombre d'animaux, deux lapins maximum par protocole d'immunisation seront utilisés. Ceci est nécessaire afin de compenser d'une part la perte éventuelle d'animaux qui n'auront pas supporté le protocole d'immunisation, et d'autre part les réponses individuelles trop hétérogènes qui conduiront à l'écart des animaux du protocole. Pour ce protocole d'immunisation, nous utiliserons 4 lapins, qui seront injectés avec 1 même antigène. L'utilisation de deux lapins constitue la quantité minimale d'animaux pour le développement d'un tel protocole. L'antigénicité des peptides a été déterminée par des logiciels de prédiction de structures secondaires et d'hydrophobicité de protéines. Afin de réduire la douleur, la souffrance et l'angoisse éventuelle suite à l'expérimentation en objet, les animaux seront traités avec des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) par administration orale pendant 5 jours. Les animaux sont élevés en cages individuelles équipées de milieux d'enrichissements appropriés.

14822 La pratique d'une activité physique (AP) régulière et modérée représente aujourd'hui un élément clé dans la prise en charge des patients atteints de cancer. L'AP induit des bénéfices sur la qualité de vie, la fatigue, les capacités physiques mais aussi sur l'évolution et la récurrence de certains cancers comme le cancer de la prostate (CaP). Malheureusement, les recommandations existant à l'heure actuelle restent trop générales et sont identiques à celles de la population générale, ne prenant en compte ni la pathologie, ni les traitements.

Dans ce contexte, notre projet vise à déterminer l'impact de différentes modalités d'activité physique sur la croissance de la tumeur de la prostate dans un modèle de rongeur et identifier les mécanismes moléculaires sous-jacents, plus particulièrement les modulations de la vascularisation tumorale et du système immunitaire. De plus, nous souhaitons isoler les effets aigus (exercice isolé) des effets chroniques (effets sur le long terme) de l'AP. Pour cela, des souris mâles seront randomisées en six groupes de 15 souris par groupe pour l'étude de l'activité physique chronique et six groupes de 15 souris par groupe pour l'étude de l'activité physique aigue (soit 180 souris au total). La croissance et la vascularisation tumorales seront mesurées chaque semaine. Afin de distinguer les effets aigus des effets chroniques induits par l'activité physique, les souris de l'étude 1 (effet de l'activité physique chronique) seront euthanasiées 48 heures après le dernier exercice physique tandis que les souris de l'étude 2 (effet de l'activité physique aigue) seront euthanasiées 1 heure après le dernier exercice. Différents prélèvements seront réalisés en vue de diverses analyses moléculaires

Ce projet de recherche a été pensé en respectant au mieux la règle des 3R.

- Remplacement ce modèle expérimental *in vivo* est nécessaire pour comprendre les changements moléculaires induit par la combinaison de l'AP et de la RT. En effet, l'effet de l'AP notamment ne peut être remplacé par un modèle *in vitro*.

- Réduction Le nombre d'animaux est choisi en fonction du nombre nécessaire permettant d'être statistiquement significatif et scientifiquement irréprochable pour valider les données obtenues à la fin de la procédure. Dans notre étude, 180 souris mâles seront utilisées pour répondre à ces exigences statistiques.

- Raffinement les animaux seront hébergés dans une structure agréée qui tient compte de l'éthique animal et assure le suivi quotidien. L'hébergement se fait dans des cages munies de jouets compatibles avec le modèle afin de minimiser le stress induit par l'hébergement. Le Raffinement est complété par une double surveillance journalière des animaux afin que les conditions de bien-être sont respectées. De plus, des mesures seront mises en place pour réduire la douleur pendant les procédures expérimentales (notamment avec l'utilisation d'anesthésie, d'analgésie et de tapis chauffant).

14823 La rate, organe clé de la filtration du sang, contient une pulpe rouge servant de cimetière aux globules rouges vieillissants, infectés par des parasites (Plasmodiums) ou rompus lors d'anémies hémolytiques (d'origine génétique ou acquise). Ces globules rouges et leur débris sont éliminés par les macrophages de la pulpe rouge (MPR) qui les mangent et recyclent le fer qu'ils contiennent. Les MPR sont donc des acteurs majeurs de l'homéostasie du fer de l'organisme et de la défense immunitaire contre certaines infections.

Il a été montré que certains types de macrophages dépendent d'un partenaire cellulaire local, qualifié de niche. Cette niche cellulaire est décrite comme un microenvironnement qui fournit le support physique immobile sur lequel une population donnée de macrophages va résider, ainsi que des signaux qui assurent la présence constante de cette même population. Les MPR - dont la niche cellulaire n'a pas encore été identifiée - résident parmi un vaste réseau ramifié de fibroblastes actuellement peu connus que nous pensons être leur niche cellulaire.

Le projet développé au sein de notre équipe vise d'une part à caractériser ces fibroblastes de la pulpe rouge (FPR) et d'autre part étudier le rôle qu'ils jouent dans le maintien de la population des MPR. Les résultats obtenus devraient permettre de mieux appréhender comment les fibroblastes nourrissent les macrophages à l'aide de signaux qui enclenchent leur survie/multiplication.

Le plan expérimental de notre projet, affiné par une étude statistique du nombre d'animaux nécessaires à l'obtention de résultats fiables, a été conçu pour respecter la règle des 3 R (Réduire, Raffiner, Remplacer).

Notre projet nécessite l'utilisation d'animaux car les macrophages et les fibroblastes sont très sensibles à leur environnement, et ces derniers sont assemblés en réseaux tridimensionnels qu'il est actuellement impossible de reproduire par des approches *in vitro*. Ceci nous oblige à étudier la complexité de leurs interactions *in vivo*, et ce chez la souris, dont la physiologie est suffisamment

proche de celle de l'homme pour que notre étude permette d'accroître nos connaissances sur l'interaction MPR/FPR dans la rate.

Notre laboratoire a mis au point différents modèles expérimentaux murins pour étudier les MPR et les FPR *in vivo* qui nous permettent d'adresser des questions similaires dans plusieurs organes et donc un même animal pourra être étudié dans le cadre de projets différents. De plus, l'expérimentation sur souris génétiquement modifiées permet d'éviter l'utilisation de drogues qui, au-delà de causer un stress chez l'animal, ont souvent des effets non-souhaités pouvant inférer avec la qualité des résultats obtenus.

Les souris sont élevées en groupes sociaux dans des environnements complexes afin de satisfaire leur instinct grégaire, de favoriser les comportements naturels et de limiter l'agressivité. Ainsi, les cages contiennent le plus souvent 5 souris et, un dôme dans lequel elles peuvent créer leur nid et s'y reposer. Les cages sont contrôlées quotidiennement par 2 animaliers qui vérifient l'état sanitaire et le bien-être des animaux. Ce suivi journalier à l'aide d'une grille de scores permet une action rapide en cas d'atteinte de points limites prédéfinis. Par ailleurs, la douleur potentielle des animaux engendrée par les manipulations est systématiquement prise en compte en mettant en place des protocoles d'atténuation de la douleur (anesthésique ou antalgique).

Pour obtenir les résultats attendus nous prévoyons d'utiliser 242 souris sur une période de 3 ans.

14824 Contexte

Les interférons de type I et III (IFN) sont des molécules clef dans la défense de l'hôte contre les infections virales, ceci via deux mécanismes distincts, mais complémentaires : l'inhibition directe de la réplication virale et l'activation du système immunitaire. Il est donc indispensable d'identifier les cellules produisant les IFN. Dans les premières phases des infections virales systémiques les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) sont la principale source d'IFN circulants dans l'organisme. Les pDC sont donc considérées cruciales pour l'immunité anti-virale. Cependant, à la fois chez l'homme et chez la souris la susceptibilité à l'infection par de nombreux virus n'est pas accrue lorsque les pDC sont absentes ou non fonctionnelles. De plus, il est important de savoir que la production d'IFN par les pDC peut être délétère dans certaines infections virales chroniques, comme par exemple l'infection par le virus du SIDA, ainsi que dans nombreuses pathologies auto-immunes.

Questions et objectifs

Notre question principale est de comprendre si, et le cas échéant, comment les IFN produits par les pDC pendant les infections virales peuvent être bénéfiques pour l'hôte. Notre hypothèse est que les IFN produits par les pDC pendant une première infection virale permettrait à l'hôte de mieux se défendre face à des infections successives par d'autres pathogènes, avec des mécanismes différents à court et à long terme. Quelques jours après la première infection, les IFN produits par les pDC augmenteraient la capacité de tous les tissus à mieux contrôler la dissémination d'un deuxième virus. A long terme (semaines/mois) les IFN produits par les pDC contribueraient à éduquer les cellules du système immunitaire à répondre plus vite et efficacement, lorsqu'exposées à un nouveau pathogène. En littérature, il a été reporté que l'exposition à des infections virales persistantes, souvent asymptomatiques, comme le cytomégalovirus (CMV), permet à l'hôte de mieux se défendre contre l'agression par de nouveaux pathogènes et que cela s'associe avec une réponse aux IFN. Cependant, la source d'IFN qui permet cette protection n'a pas encore été identifiée. Par conséquent, nos objectifs sont de déterminer si des souris infectées au préalable par une infection virale aigue systémique (CMV murin, MCMV) contrôlent mieux des infections locales secondaires (virus de la grippe, IAV) et, si oui, si les pDC sont impliquées dans ce contrôle. Pour faire cela nous disposons de modèles murins mutants uniques et novateurs permettant une ablation sélective soit constitutive soit transitoire des pDC. Dans nos conditions et nos modèles murins l'infection par le MCMV comporte une perte de poids faible, graduelle et transitoire (10-15 % sur les 4 premiers jours d'infection), qui est totalement récupérée une semaine après infection. Cela n'affecte pas la survie des souris, comme d'ailleurs c'est le cas chez l'homme dans des individus non immunodéprimés. En revanche, l'infection par le virus de la grippe peut être fatale chez

l'homme. Chez les jeunes enfants et les personnes âgées IAV expose à un risque accru de surinfection pulmonaire de type bactérien, alors que chez les jeunes adultes la maladie est plutôt due à une activation exacerbée du système immunitaire face à l'infection. La souche d'IAV que nous allons utiliser dans notre projet reproduit ce type d'immunopathologie humaine et augmente à la fois la morbidité et la mortalité des souris infectées. Nous nous attendons que les souris infectées par MCMV soient plus résistantes à l'infection secondaire par IAV et que cette protection dépende des pDC et surtout de leur production d'IFN. Si notre hypothèse de travail se confirme correcte, cela aura l'avantage de permettre de développer de nouveaux traitements ciblant les pDC et améliorant la protection de l'hôte face aux infections virales. Les dommages seront contenus en limitant autant que possible le nombre d'animaux nécessaire pour effectuer nos études et en assurant un suivi quotidien des animaux lors des expériences.

Conformité de la règle des 3R

Remplacement : Ce projet nécessite la mesure de différents paramètres de la réponse immunitaire au cours d'infections. Ainsi l'intégration d'un système vivant et complet est indispensable. La physiopathologie de la souris est suffisamment proche de celle de l'homme pour que son étude nous permette d'accroître nos connaissances sur le fonctionnement du système immunitaire chez l'homme. Par ailleurs, la taille, la rapidité du cycle de reproduction et la génétique de la souris en font le modèle le mieux approprié pour les études envisagées pour lesquelles des animaux génétiquement modifiés sont nécessaires. Ainsi le modèle murin est un modèle de choix pour notre étude.

Réduction : Nous utiliserons 723 souris pour mener à bien cette étude. Tous ces animaux seront sous fond génétique homogène C57BL/6J pour nous permettre de réduire le nombre d'animaux utilisés en évitant au maximum les variabilités interindividuelles des animaux sous fonds génétiques mixtes. Ainsi, chaque expérience devrait pouvoir être répétée indépendamment deux fois, avec 4-5 animaux par groupe, minimum requis pour s'assurer de la bonne reproductibilité des résultats.

Raffinement : Pour limiter le stress des animaux, les souris seront élevées dans des animaleries conventionnelles et de niveau 3 exemptes d'organisme pathogène spécifique (EOPS). La température, l'hygrométrie et la photopériode sont contrôlées et régulées. Un animal bénéficiera d'au moins 100 cm² de surface. Les animaux seront gardés tant que possible en groupes sociaux stables formés d'individus compatibles. Ils disposeront de matériel pour confectionner des nids et des dômes protecteurs, notamment pour les animaux placés en hauteur car trop exposés à la lumière. Pour les animaux affaiblis, l'accès à la nourriture et à l'eau sera favorisé. Un système de scoring de la douleur sera scrupuleusement appliqué pour évaluer les signes de souffrance relatifs à l'expérimentation en cours, et les animaux atteignant les points limites définis seront immédiatement euthanasiés.

14825 La reproduction sexuée, chez les organismes eucaryotes qui incluent les animaux, nécessite la formation de gamètes (« ovules » et spermatozoïdes) auxquels est transmise la moitié du matériel génétique du parent. La fécondation permet, en réunissant les chromosomes des gamètes de chacun des deux parents, de reconstituer des cellules qui possèdent une paire de chaque chromosome, un exemplaire étant fourni par la mère, l'autre par le père. Nous étudions les mécanismes qui permettent la transmission correcte des chromosomes aux gamètes lors de la division spécialisée appelée méiose. Plus précisément, nos projets actuels visent à comprendre le rôle de plusieurs protéines dans ce processus, chez le mâle. Dans ce projet, nous mettrons en place un protocole par administration d'acide rétinoïque qui permet de synchroniser *in vivo* les gamètes de souris mâles afin de contrôler leur entrée en méiose et afin d'enrichir les spermatocytes se trouvant au même stade de la méiose, permettant ainsi de réduire le nombre d'animaux utilisés par expérience. Pour ce projet nous appliquerons la règle des 3R

- Le remplacement Il existe à l'heure actuelle aucun protocole *in vitro* qui permet de produire des spermatocytes à des stades précis en nombre suffisamment grand pour faire des études biochimiques afin d'élucider le rôle de ces protéines, l'utilisation d'animaux est donc indispensable.

- Le raffinement Aucun des animaux utilisés ne souffrira d'un phénotype dommageable dans nos conditions d'élevage (cage de taille adaptés et enrichissement en carré de cellulose) et le traitement qui leur est administré dans une fenêtre de temps précise agira seulement sur les gamètes et n'aura aucun effet dommageable sur les animaux. Ces animaux sont pesés tous les jours pendant les premiers 7 à 9 jours de traitement, s'ils ne prennent pas de poids par rapport aux animaux témoins ils seront mis à mort. Ensuite, pendant les prochaine 7 à 42 jours les animaux seront observés de façon régulière par les zootechniciens pendant le change et par l'expérimentateur environ tous les 2 à 4 jours. Comme le traitement n'a pas d'effet délétère chez la souris, aucun point limite peut être fixé. Néanmoins, si les animaux montrent un comportement anormal, celui-ci sera analysé et un score selon la grille de douleur de Morton et Griffiths lui sera attribué. Si nécessaire (au-delà du score 10) l'animal sera mis à mort.

- La réduction Les protocoles sont optimisés pour réduire au maximum le nombre d'animaux nécessaires. En particulier, les techniques biochimiques sont revues régulièrement pour réduire la quantité de matériel, et donc d'animaux, nécessaires. Nous estimons que 447 souris pour mener à bien notre projet. L'élevage est réalisé dans des conditions supervisées par la cellule locale du bien-être animal

14826 Le cancer du côlon représente le troisième cancer en termes d'incidence et de mortalité par cancer dans le monde, touchant les deux sexes de façon quasiment identique. La forte mortalité associée à ce cancer dépend du développement des métastases, pour lesquelles il n'existe à ce jour aucun marqueur ni traitement spécifique. Les phénomènes qui conduisent à la croissance de la tumeur primaire et à la formation des métastases sont complexes et font intervenir de multiples paramètres tels que la prolifération mais aussi l'invasion de la matrice extracellulaire, la survie et la distribution dans la circulation lymphatique/sanguine, la colonisation d'organes à distance de la tumeur primaire. Il est primordial de déterminer les mécanismes impliqués dans la progression métastatique afin d'individualiser des facteurs pronostics, ainsi que des cibles thérapeutiques. Ces phénomènes complexes ne peuvent pas s'étudier exclusivement *in vitro* et nécessitent l'utilisation de modèles animaux qui prennent en compte ces différentes propriétés ainsi que les spécificités d'organe.

Les canaux sodiques dépendants du voltage NaV sont exprimés anormalement dans les tumeurs et cellules cancéreuses coliques humaines. Leur expression et activité stimulent l'invasion cancéreuse *in vitro* et il est possible qu'ils participent à la croissance tumorale et à la formation des métastases *in vivo*.

Un certain nombre d'études *in vitro* ont été réalisées préalablement afin de comprendre le rôle de ces canaux et ce projet a maintenant pour objectif de comprendre le rôle de NaV1.5, et de sa sous-unité NaVbeta4, dans le développement des métastases *in vivo* et d'évaluer le potentiel bénéfique de drogues qui cibleraient ces canaux.

Nous utiliserons un modèle de xénogreffes au niveau du caecum de cellules cancéreuses coliques humaines, modifiées génétiquement pour l'expression du gène de la luciférase (pour le suivi en imagerie de bioluminescence) et pour l'expression ou non de NaV1.5 ou NaVbeta4, chez la souris immunodéprimée afin de suivre la croissance tumorale et le développement métastatique. Les cellules seront greffées au niveau de la membrane du caecum et un suivi de la prolifération sera réalisé par imagerie de bioluminescence non invasive à différents temps, typiquement de façon hebdomadaire. Des échographies seront réalisées afin de mesurer le volume de la tumeur primaire.

Les dommages attendus pour les animaux sont liés au développement d'une tumeur primaire au niveau du colon et éventuellement de métastases (problèmes digestifs, amaigrissement). Une excellente connaissance des animaux, la mise en place d'un suivi rigoureux et une évaluation quotidienne du stress ou de la souffrance engendrée chez l'animal s'appuyant sur des grilles de "scoring" nous permettront d'anticiper la douleur produite chez nos animaux. Les animaux seront anesthésiés au cours des examens d'imagerie.

Ce projet nécessitera 482 souris et sera réalisé conformément à la règle des 3R

- Remplacer de nombreuses études des canaux sodiques ont été réalisées *in vitro*. Les études mises en oeuvre dans ce projet doivent maintenant tenir compte de la complexité d'un organisme vivant et ne peuvent pas être réalisées *in vitro*
- Réduire la mise en oeuvre de l'imagerie permet un suivi longitudinal du même animal ce qui permet de réduire leur nombre au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement pertinents et reproductibles, évitant ainsi de refaire plusieurs fois les mêmes expérimentations
- Raffinement le suivi de la croissance tumorale primaire et secondaire (métastases) sera réalisé par imagerie de bioluminescence *in vivo* et d'échographie, approches non invasives et indolores pratiquées par ailleurs sur animal anesthésié. Des antalgiques seront utilisés lors de la chirurgie et 24h après. Par ailleurs, les souris seront hébergées en portoir ventilé et en accord avec les directives européennes. des grilles de scoring avec des points limites prédictifs seront mis en place et le personnel observera quotidiennement les animaux afin d'anticiper la souffrance animale.

14827 Le recours aux animaux à des fins scientifiques s'explique par la possibilité d'étudier un modèle de maladie semblable à la maladie développée chez l'homme et ainsi permettre de mieux comprendre le mode de fonctionnement/ développement de cette pathologie. Les modèles animaux permettent également d'étudier l'innocuité et l'effet d'une molécule, ou d'une combinaison de molécules dans un organisme entier, comportant différents systèmes (sanguin, immunitaire, nerveux, hormonal...) et appareils (digestif, respiratoire, uro-génital...) qui interagissent ensembles de façon complexe à l'échelle d'un corps. Enfin, l'efficacité de thérapies innovantes peut également être testée dans des modèles expérimentaux mimant la pathologie humaine, avant de pouvoir être transférée chez l'homme.

Les primates non-humaines (PNH) comme les porcs, de par leur proximité phylogénique, leur taille, leurs similitudes morphologique, anatomique, physiologique, métabolique et leur similitude de système immunitaire avec l'homme constituent de très bons modèles pour les études dites précliniques. Ces études arrivent en dernières phases de tout projet scientifique, quand la preuve de concept a été réalisée dans d'autres modèles *in vitro*, *ex vivo* et/ou *in vivo* chez d'autres espèces en répondant à différentes questions, étapes par étapes ces études permettent de valider les hypothèses avant de progresser chez l'homme.

Une fois les protocoles autorisés terminés, nous essayons autant que possible soit de placer les animaux, soit d'introduire les animaux dans un nouveau protocole scientifiquement et réglementairement compatible avec le précédent, dans le but de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés (3R). Cependant, la réutilisation des animaux dans de nouveaux protocoles impose de tenir compte de la récupération de l'animal à recouvrer son état de santé et son bien-être général et de l'effet cumulé des différentes procédures.

Ces solutions n'étant pas toujours possibles pour ces diverses raisons, nous pouvons être amenés en dernier recours à euthanasier les animaux en fin de protocole. L'objectif de ce projet, qui concerne ce dernier groupe d'animaux, est de réaliser des prélèvements multi-organes et d'échantillons biologiques sous procédure complète d'anesthésie, en amont de l'euthanasie, dans des conditions similaires aux prélèvements d'organes chez l'homme.

Ces organes ainsi prélevés selon les protocoles de l'Agence de Biomédecine (ABM) pourront servir à différents test *ex vivo*

- à l'apprentissage des techniques et/ou nouvelles techniques de prélèvements par les professionnelles (uniquement sur les porcs)
- à des tests *ex vivo* de mise sur machine de conservation d'organes
- à des tests *ex vivo* de perfusion sur machine dans des différentes conditions de pré-conditionnements
- à des tests *ex vivo* d'isolement de cellules à partir d'organes pour culture *in vitro*.
- à des tests *ex vivo* de marquage tissulaire
- à des tests *ex vivo* de RT-PCR quantitative de différents marqueurs biologiques spécifique d'espèce et d'organes (métaboliques, immunologiques, hormonaux, ...)

-à des partages de tissus avec la communauté scientifique.

Utiliser ces animaux permettra de ne pas racheter d'autres animaux pour les tests décrits ci-dessous et contribuera donc à la réduction du nombre d'animaux utilisés dans notre laboratoire.

Cette demande d'autorisation inclura au maximum 10 primates et 20 porcs par an soit un maximum de 150 animaux pour 5 ans. Les prélèvements seront réalisés sous procédure complète d'anesthésie et un traitement analgésique sera donné aux animaux en amont du prélèvement.

Il n'existe pas de remplacement possible pour l'obtention de ces organes, cependant l'utilisation de ces animaux répond aux exigences de réduction et de raffinement.

Les primates sont hébergés en volière de façon à respecter leur mode de vie en communauté.

Les porcs, selon leur taille et leur comportement, sont hébergés par 1, 2 ou 3 par boxes, au sein d'une même pièce.

14828 Le projet vise à mesurer en conditions expérimentales la corrélation entre la consommation d'oxygène, la fréquence et l'amplitude respiratoire chez des adultes de lamproies marines (*Petromyzon marinus*), fluviatiles (*Lampetra fluviatilis*) et de Planer (*L. planeri*). L'objectif est de tester la validité de la fréquence et de l'amplitude respiratoire comme indicateur du métabolisme, afin d'utiliser cet indicateur sur le terrain où la consommation d'oxygène n'est pas mesurable. Comme le métabolisme est affecté par de nombreuses pressions (température, pollution) et conditionnant de nombreux processus écologiques (mouvements, reproduction), il est une variable cruciale pour comprendre l'effet de perturbations environnementales sur le fonctionnement des individus, des populations et des écosystèmes.

Le principe de l'expérience consiste à collecter des lamproies en milieu naturel, les transporter au laboratoire, pour les placer individuellement dans des chambres respirométriques où on mesurera leur consommation d'oxygène grâce à des sondes optiques. En parallèle, elles seront filmées en haute définition afin de mesurer leur fréquence respiratoire (nombre d'ouvertures de fentes branchiales par seconde) et leur amplitude respiratoire (nombre de fentes branchiales activées).

Il n'est pas possible de remplacer l'expérimentation animale par une autre approche, car les données recherchées concernent le métabolisme et le comportement d'individus entiers. Il est nécessaire de travailler sur ces espèces car le métabolisme des lamproies et son lien avec le rythme respiratoire ne peut pas être directement transposé depuis d'autres espèces. De plus, l'objectif à terme est de développer un indicateur du métabolisme qui ne nécessite que l'observation visuelle des lamproies, possible dans le milieu naturel.

Dix lamproies de chaque espèce seront testées, pour un total de 30 individus. Chaque lamproie sera placée une fois dans le dispositif expérimental, où sa consommation d'oxygène et son rythme respiratoire seront mesurés à 10 reprises. A partir de 30 individus, on obtiendra alors 300 points de données, constituant l'effectif minimal avec lequel nous pourrions tester efficacement la corrélation entre la consommation d'oxygène, la fréquence et l'amplitude respiratoire, en incluant l'effet de l'espèce et la variabilité inter-individuelle.

Les procédures seront exécutées de la manière la moins stressante pour les lamproies. Les lamproies marines et fluviatiles seront acquises auprès de pêcheurs professionnels, qui les commercialisent normalement pour la consommation humaine. Les lamproies de Planer seront capturées par pêche à l'électricité, selon des pratiques limitant le stress pour les animaux (traits d'anodes brefs, sortie rapide de l'eau, stabulation dans un vivier baignant dans la rivière à distance de la zone de pêche). Chaque lot de dix lamproies sera transporté séparément dans un véhicule agréé contenant une cuve de transport de 70 L d'eau du lieu de capture (ou du vivier du pêcheur fournisseur) aérée avec un bulleur. Une fois au laboratoire, les lamproies seront maintenues pendant quelques jours dans des aquariums de 100 L (lamproies fluviatiles et de Planer) ou des bacs de 1000 L (lamproies marines) alimentés en eau de rivière par un circuit ouvert (paramètres physico-chimiques naturels) et enrichis en substrat (cailloux) et abris (briques creuses, racines). Aucune alimentation ne sera apportée car les lamproies adultes ne se nourrissent pas. Pour les tests de respirométrie, chaque lamproie sera placée pendant 15 heures dans un tube en verre alimenté par de l'eau thermorégulée et saturée en oxygène entre 90% et 100%. La taille des tubes

est adaptée à la taille des lamproies (7 cm de diamètre sur 25 cm de long pour les lamproies fluviatiles et de Planer, qui mesurent respectivement 3 et 1 cm de diamètre et 20 et 15 cm de longueur 15 cm de diamètre sur 100 cm de long pour les lamproies marines, qui mesurent 6 cm de diamètre et 70 cm de longueur). Des observations en aquarium montrent que les lamproies passent beaucoup de temps immobiles dans des abris exigus (sous des tuiles, dans des tubes PVC), et ne devraient donc pas souffrir du manque d'espace dans les tubes de respirométrie. L'éventuel stress des lamproies serait facilement détectable dans cette expérience car il aurait pour effet d'augmenter la consommation d'oxygène, qui est la variable mesurée. Des individus particulièrement agités seraient aussi rapidement repérés car ils seront filmés durant les tests. De tels individus seraient replacés dans leur bac de stabulation.

Chaque individu sera testé en une demi-journée puis replacé dans un bac de stabulation. Une fois tous les individus testés, ils seront anesthésiés puis euthanasiés pour décrire leur composition corporelle, donnée qui sera mise en relation avec le métabolisme.

14829 La neurogenèse est un processus qui implique la prolifération et la différenciation des cellules souches neurales. Chez l'adulte, la neurogenèse s'établit dans des régions bien spécifiques du cerveau dont la zone sous-ventriculaire (SVZ). Les cellules souches neurales de la SVZ sont capables de générer soit des neurones qui participent à la fonction olfactive (principalement développée chez les rongeurs), soit des cellules gliales telles que les oligodendrocytes qui protègent les axones des neurones via la production de myéline (myélinisation) et permettent ainsi d'accélérer la propagation de l'information nerveuse. De nombreux signaux, tels que les signaux thyroïdiens, régulent la prolifération des cellules souches neurales ainsi que leur différenciation. De plus, de récents travaux montrent qu'au cours du vieillissement des rongeurs, la production de nouveaux neurones diminue alors que la génération de nouveaux oligodendrocytes semble être maintenue.

Notre projet actuel vise à étendre nos connaissances sur la régulation du destin des cellules souches neurales au cours du vieillissement et de relier ces résultats aux taux circulants d'hormones thyroïdiennes. Ces études seront réalisées chez la souris (*Mus musculus*), modèle bien caractérisé pour l'analyse des processus de neurogenèse adulte, leur régulation par les hormones thyroïdiennes ainsi que pour l'étude des différents comportements d'olfaction. Nous utiliserons la lignée de référence C57BL/B6, lignée la plus utilisée par les laboratoires de recherches. Dans ce projet, nous souhaitons déterminer si le vieillissement altère les capacités olfactives des souris et analyser les capacités de remyélinisation des oligodendrocytes chez la souris vieillissante en utilisant un protocole basé sur la démyélinisation (i.e. la mort des oligodendrocytes) et l'étude de la remyélinisation (capacité de myélinisation des oligodendrocytes nouvellement formés). En effet, il est bien connu que les capacités de réparation sont limitées chez les individus âgés en cas de lésions cérébrales, notamment en cas de lésions de démyélinisation qui apparaissent chez les patients atteints de sclérose en plaques. Ce protocole sera utilisé sur des souris à différents âges de la vie, à savoir des souris de 2 mois (jeunes adultes), de 12 mois (souris d'âge moyen) et 18 mois (souris vieillissantes). Pour ce projet, seules les souris mâles seront utilisées, en raison des interactions entre le cycle des femelles et les différentes signalisations hormonales. De plus, il est nécessaire de travailler *in vivo* car la myélinisation est un phénomène complexe, qui ne peut pas être reproduit *in vitro*. De même, afin d'étudier le comportement des animaux, nous sommes dans l'incapacité de remplacer cette étude par des tests *in vitro* par exemple.

La procédure appliquée (dans le respect du bien-être animal) vise à limiter le nombre d'animaux par groupe expérimental, dans la limite des besoins en termes d'analyses statistiques. Sur une durée de projet fixée à 3 ans, nous estimons à 108 le nombre maximum de souris mâles nécessaires. En effet, nous utiliserons 12 animaux/groupe, 3 groupes par tranche d'âge (un groupe d'animaux contrôles, un groupe d'animaux ayant subi la phase de démyélinisation, et un groupe d'animaux pour étudier la remyélinisation). Suite à des prélèvements de sang sous anesthésie profonde, des tissus (notamment le cerveau) seront prélevés post-mortem afin de réaliser des analyses histologiques et moléculaires. Les prélèvements de sang et de tissus seront réalisés en parallèle sur le même animal et ce, dans un souci de réduction du nombre d'animaux sacrifiés. La

procédure, de classe modérée, vise à induire la mort des oligodendrocytes (démýélinisation) par l'utilisation d'un neurotoxique, la cuprizone, à une concentration et pendant une durée n'induisant pas de phénotype délétère. Suite à cette phase de démýélinisation, une phase de récupération par injection d'hormones thyroïdiennes sera effectuée (phase de remýélinisation). En parallèle, nous étudierons les capacités olfactives de ces mêmes animaux vieillissants à différentes périodes du protocole, à savoir avant le traitement de démýélinisation, avant et après la phase de récupération. Cette analyse cognitive nous permettra de déterminer si le vieillissement altère les capacités olfactives des souris et si ces capacités peuvent également être modulées par le traitement cuprizone et le traitement aux hormones thyroïdiennes.

Au cours de ce projet, les animaux seront étroitement surveillés et ce, dès leur arrivée dans notre animalerie jusqu'au jour du sacrifice fixé avant la période de démýélinisation pour les animaux contrôles (CTL), ainsi qu'avant et après la période de remýélinisation. Notons toutefois que si les souris présentent des signes de stress (perte de poids, prostration, pelage altéré), le projet sera immédiatement stoppé et les objectifs initialement prévus du projet seront réévalués. Pour optimiser l'expérimentation tout en suivant la règle des 3R, nous mettrons en place un dispositif de raffinement qui consistera à héberger 4 souris par cage pour éviter une « surpopulation ». Nous placerons, dans chaque cage, des igloos et du coton qui permettront de réduire au mieux l'inconfort ou le stress des animaux.

14830 Les maladies de la valve mitrale représentent la 2ème valvulopathie après l'atteinte aortique. Environ 2500 patients sont traités annuellement en France, en général par chirurgie cardiaque voire par les nouvelles techniques de réparation percutanée. Ces techniques, sans chirurgie cardiaque lourde (pas de circulation extra corporelle (CEC), présentent de nombreux intérêts pour le malade. Aussi le développement de valves mitrales positionnées sans CEC est une voie de recherche importante, notamment pour les patients dont la valve ne peut être réparée.

Avant la réalisation d'implantation chez l'Homme d'une nouvelle valve par les équipes concernées, il est nécessaire de bénéficier d'une formation théorique et pratique et notamment de réaliser la procédure de manière aussi réaliste que possible. La première partie de la formation est au préalable réalisée sur des systèmes inertes tant au niveau pratique que théorique.

Réaliser la procédure complète chez l'animal vivant est toutefois indispensable pour acquérir les compétences techniques, échographiques et interventionnelles avant de réaliser le geste chez l'homme en toute sécurité.

L'échographie et les rayons X guident le déploiement de la valve et la qualité du résultat final est dépendant des tractions exercées pour contrebalancer l'effet des battements cardiaques. L'ensemble de ces données (visualisation / traction) ne peut pas être acquise sur un système inerte ou un simulateur (REPLACEMENT).

Cette deuxième phase pratique nécessite l'utilisation d'animaux vivants dont l'anatomie se rapproche autant que possible de celle de l'homme. Dans le cadre de ce projet, le modèle porc a été choisi, un maximum de 100 animaux sur 5 ans sera inclus dans ce projet de formation. La formation a lieu par session d'une journée au cours de laquelle deux à quatre équipes réalisent la procédure sur un même animal. Chaque équipe est constituée de trois médecins qui sont en général un cardiologue interventionnel, un chirurgien et un échocardiographe. Pour minimiser le nombre d'animaux utilisés (REDUCTION), il n'est prévu qu'un animal par session sur lequel la procédure sera réalisée plusieurs fois.

Le RAFFINEMENT du projet et le respect du bien-être animal reposent sur plusieurs mesures

- les animaux sont hébergés dans des locaux agréés et bénéficient de soins quotidiens dispensés par du personnel compétent et soucieux du bien-être animal
- les animaux sont habitués au personnel animalier afin de limiter tout stress
- les animaux sont hébergés en groupes sociaux ce qui leur permet d'exprimer des comportements naturels ils disposent d'enrichissements adaptés (jouets balle, chaîne, grattoir)

- la procédure est réalisée sous anesthésie générale (mise en œuvre et surveillée par du personnel dédié) et une analgésie adaptée est systématiquement mise en place
- des critères d'alerte précis sont surveillés; si l'animal présente un signe d'appel, des mesures adaptées sont mises en place immédiatement (ajout d'analgésique par exemple).

14831 Les anticorps sont des protéines produites par le système immunitaire pour assurer la sécurité de l'organisme et lutter contre les infections. Malheureusement, dans certaines situations, la production par le système immunitaire d'anticorps anormaux qui attaquent des protéines présentes à la surface des neurones entraînent des maladies neurologiques et psychiatriques graves. L'expression aberrante d'anticorps s'attaquant aux récepteurs NMDA du glutamate est par exemple la cause d'encéphalites (inflammations du cerveau). Elle est également associée à certaines formes de schizophrénie. Malheureusement, de nombreux aspects du mode d'action de ces anticorps anormaux restent inconnus, et on ne comprend en particulier pas pourquoi ils ciblent préférentiellement certaines régions du cerveau comme l'hippocampe et pas d'autres. Nous pensons que des variations de l'environnement entourant les neurones d'une région à l'autre du cerveau pourraient expliquer cette distribution particulière des anticorps. Nous nous proposons donc dans ce projet d'étudier comment les autoanticorps humains se dispersent dans le cerveau en fonction de l'architecture de l'espace baignant les neurones. Pour cela, nous allons injecter dans le cerveau de rats des autoanticorps humains de patients atteints d'encéphalite, de schizophrénie ou de lupus couplés à des nanoparticules fluorescentes permettant de suivre leur dispersion et leur accumulation dans l'environnement neuronal des différentes régions du cerveau. Ces injections se feront directement dans les ventricules cérébraux, qui sont des poches remplies du liquide céphalo-rachidien qui irrigue le cerveau, et auront lieu entre le 10ème et le 12ème jour post-natal, période qui correspond au stade infantile chez le rat et à l'âge où apparaissent chez l'homme les premiers symptômes causés par la production de ces anticorps anormaux. Les animaux seront ensuite sacrifiés entre 2 et 6 h après injection et des expériences de microscopie et des enregistrements électrophysiologiques de l'activité des neurones seront menés pour caractériser la localisation des anticorps dans le cerveau et leur impact sur le fonctionnement des régions cérébrales où ils s'accumulent. Les approches de microscopie et d'électrophysiologie de ce projet menées pour étudier la distribution et l'impact des auto-anticorps humains nécessitent d'utiliser des animaux. Les autres méthodes alternatives développées actuellement (*in vitro*, modélisation) ne permettent pas de reproduire la complexité du cerveau (remplacement). Cependant, la règle des 3R a été mise en place dans la conception de notre projet et une planification précise des expériences a été établie afin de réduire au maximum le nombre d'animaux inclus dans cette étude, tout en ayant des groupes suffisamment importants pour obtenir des statistiques solides. Nous proposons ainsi un projet portant sur 420 rats (réduction), avec un nombre de 20 animaux par groupe déterminé comme nécessaire pour l'analyse des tests d'imagerie et d'électrophysiologie sur les cerveaux prélevés post mortem chez les animaux traités et témoins. Une attention permanente sera portée au bien-être des animaux avant et tout au long du protocole (raffinement), notamment en assurant un enrichissement adéquate de leur milieu : papier tressé pour les mères, tunnels en carton dans des cages d'hébergement conçues pour qu'ils puissent exprimer leur comportement naturel. Ils seront surveillés quotidiennement par des personnels compétents et formés. Les douleurs consécutives à la chirurgie seront soulagées à l'aide des molécules les plus adaptées au protocole et à l'état des animaux. Aucune des données recueillies sur les composés injectés dans les ventricules cérébraux ne prédisent que ces injections seront douloureuses. Néanmoins, l'état des animaux sera particulièrement surveillé durant le temps de ces injections et des mesures adaptées seront prises dans la cas contraire. Des points limites suffisamment prédictifs sont définis pour limiter la souffrance tout au long de la vie de l'animal. En cas de souffrance ou de détresse persistante, les animaux seront mis à mort dans des conditions qui évitent souffrance et stress.

14832 De nombreuses bactéries vivent dans le tube digestif, elles représentent 90% du microbiote intestinal. Celui-ci régule le métabolisme énergétique et le système immunitaire.

Ces bactéries produisent une grande diversité de substances bactéricides, appelées bactériocines. Ces bactériocines agissent comme des antibiotiques et permettent aux bactéries qui les produisent de se défendre contre des bactéries pathogènes. Elles permettent ainsi la protection de leur hôte vis-à-vis de ces bactéries nocives, responsables d'intoxications alimentaires par exemple.

Nous utiliserons un modèle préclinique de souris, rendues obèses et prédiabétiques par un régime alimentaire riche en graisses. Ces animaux souffrent également de dysbiose (un déséquilibre du microbiote intestinal).

Suite à des recherches bibliographiques, nous avons sélectionné une bactériocine qui pourrait, dans ce modèle de souris, avoir un effet bénéfique sur la glycémie.

Les résultats préliminaires ont permis de valider cette hypothèse, à savoir un effet positif d'un traitement par cette bactériocine sur la glycémie et la sécrétion d'insuline, chez des souris obèses et prédiabétiques.

Actuellement les objectifs sont de confirmer ces premiers résultats, déterminer le mode d'administration et la dose les plus efficaces, comprendre le mode d'action de cette bactériocine.

Ainsi cette molécule pourrait constituer une nouvelle classe de médicaments pour le traitement du diabète de type 2.

Au cours de cette étude, qui durera 3 ans, nous utiliserons 256 animaux. Chaque groupe expérimental sera constitué de 8 souris. Huit est le nombre minimal pour obtenir des résultats statistiquement fiables et interprétables dans le domaine de la diabétologie, et ce dans une optique de réduction des animaux expérimentaux. Par ailleurs, il n'existe pas actuellement de modèle *in vitro* permettant de tester le rôle de cette molécule sur le métabolisme et en particulier sur le paramètre de la glycémie, qui est la résultante de plusieurs processus physiologiques. Le Remplacement de ces expériences *in vivo* n'est donc pas possible. Toutes les précautions possibles (utilisation d'anesthésie, d'antalgique, habitude, ...) seront prises afin de Raffiner nos procédures et réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux, dans le respect de la règle des 3R.

14833 Malgré la reconnaissance des effets positifs de l'exercice physique sur la santé, la sédentarisation ne fait qu'augmenter, et ce, pour des raisons socioculturelles mais également biologiques (e.g. faible motivation pour l'exercice). Cette sédentarisation croissante est devenue un problème majeur de santé publique eu égard à ses conséquences pathologiques et financières. L'obésité, qui associe une forte motivation pour la prise de nourriture à un déficit de motivation pour l'exercice physique, illustre ce propos. Inversement, une motivation excessive pour l'exercice physique aux dépens de la motivation pour se nourrir, i.e. un déséquilibre décrit dans l'anorexie nerveuse restrictive, souligne la nécessité de connaître les bases neurobiologiques de la motivation pour l'exercice physique. A l'aide de procédures de conditionnement opérant chez la souris, il a été récemment rapporté que le système endocannabinoïde contrôle de manière tonique la motivation pour l'exercice physique. Plus précisément, ce contrôle s'effectue par l'intermédiaire de récepteurs aux cannabinoïdes de type 1 (CB1) situés sur des neurones GABAergiques, possiblement localisés dans l'aire tegmentale ventrale. L'aire tegmentale ventrale (ATV) et la substance noire pars compacta (SNpc) sont les deux noyaux d'où les neurones dopaminergiques mésencéphaliques se projettent sur le cerveau antérieur pour réguler respectivement les processus de motivation et les processus moteurs. Dans ce cadre, on pourra noter qu'il existe une relation linéaire entre le niveau de motivation pour l'exercice physique et l'activité des neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale, cette activité étant mesurée chez l'animal anesthésié après la tâche comportementale. Enfin une récente étude a montré des différences au niveau des processus motivationnels impliqués dans l'activité physique entre les mâles et les femelles.

Le présent projet a pour objectif de caractériser chez des souris mâles et femelles le rôle du système endocannabinoïde dans la modulation de l'activité des neurones dopaminergiques mésencéphaliques chez l'animal vigile au cours de l'exercice physique. Afin d'étudier ce rôle en relation avec la motivation pour l'exercice physique et ses conséquences motrices, nous nous focaliserons sur l'aire tegmentale ventrale et la substance noire.

Pour ce faire, nous associerons des approches comportementales, génétiques et électrophysiologiques. En bref, pour chacune des lignées mutantes pour le récepteur CB1, l'activité neuronale des régions d'intérêt (ATV et SNpc) sera enregistrée en temps réel lorsque l'animal réalisera la tâche comportementale, i.e. le conditionnement opérant pour l'activité physique. Ce conditionnement opérant associé aux mesures électrophysiologiques est l'unique moyen d'étudier l'activité neuronale sous tendant (i) la motivation pour l'activité physique, attestée par l'effort maximal que l'animal est prêt à fournir pour accéder à la roue d'exercice, et (ii) les capacités motrices attestées par les performances dans la roue d'exercice (temps et distance de course à chaque accès).

Ce projet s'attachera particulièrement au respect des 3R.

Remplacer Les circuits cérébraux impliqués dans la motivation pour l'exercice physique ainsi que son pendant moteur sont peu décrits. L'étude de l'activité neuronale liée à ces deux dimensions de l'exercice physique repose sur un acte volontaire de l'animal, ce qui rend impossible l'utilisation (i) de méthodes *in vitro* reposant sur des cultures cellulaires (ii) d'enregistrements sur animal anesthésié. Ce protocole nécessite donc l'utilisation d'animaux vigiles.

Réduire Le nombre d'animaux nécessaires est calculé par estimation de la variabilité individuelle inhérente aux études comportementales. Le nombre minimal nécessaire à l'obtention de statistiques fiables a été retenu. En considérant l'utilisation de souris des 2 sexes, pour les 2 régions d'intérêt dans chacune des lignées mutantes pour le récepteur CB1, le total est de 1080 souris sur 5 ans

Raffiner Plusieurs procédures seront mises en place pour réduire au maximum la souffrance des animaux inclus dans le projet. Un suivi des animaux sera réalisé sur la base d'une grille d'évaluation validée (Morton et Griffith, 1985), associé à des protocoles de gestion et minimisation de la douleur lorsque cela sera nécessaire.

14834 Chez la femme enceinte, une situation de stress chronique au cours de la gestation peut être perçue comme une douleur psychologique qui entraîne des conséquences comportementales ainsi que métaboliques chez la descendance pouvant perdurer tout au long de la vie du fœtus jusqu'à un âge avancé chez l'adulte. Au cours de sa vie, l'individu pourra subir des agressions environnementales qui viendront modifier encore, de façon ou non durable, ce comportement et son métabolisme. En particulier, l'adolescence représente une période de vulnérabilité que ce soit au stress ou aux drogues. Un phénomène assez inquiétant ces dernières années qui atteint 15 à 20% des adolescents des pays occidentaux, correspond à la consommation excessive d'alcool sur une courte période de temps, par épisodes ponctuels ou répétés (binge drinking). Cette consommation entraîne des troubles à courts termes sur le plan médical avec intoxication alcoolique aiguë mais également à moyen et long terme. Dans ces deux derniers cas, on observe des lésions de la substance blanche cérébrale qui s'accompagne d'anomalies de l'électroencéphalogramme avec atteinte de la fonction cérébrale. Ces dysfonctionnements cérébraux ne sont pas les mêmes chez la femme ou chez l'homme. Par exemple, au test de reconnaissance spatiale, les "buveurs" masculins semblent plus lents à apporter des réponses correctes que les femmes mais ont de meilleurs résultats que les "buveuses" en mémoire spatiale et reconnaissance de formes.

Il est possible, chez des modèles animaux, de mimer le stress au cours de la période périnatale et d'observer ses conséquences chez le fœtus mais également chez la descendance adulte voire âgée qui se traduisent notamment par l'apparition de pathologies aussi bien biologiques (hypertension, diabète...) que comportementales (émotion, mémoire spatiale...). De même, il est observé une vulnérabilité accrue par exemple aux psychostimulants (cocaïne, amphétamine, nicotine) chez le rat mâle tandis que chez la femelle et pas chez le mâle, le stress périnatal favorise la consommation spontanée d'alcool à l'adolescence.

Notre demande de projet concerne l'étude des effets d'une exposition à la consommation excessive d'alcool (éthanol) de type « binge » pendant une période critique telle que l'adolescence chez un modèle animal de stress périnatal.

- La première partie de la procédure expérimentale a pour but de mettre en évidence les effets à court terme de l'alcool au cours de l'adolescence, sur le comportement de type émotionnel et la mémoire spatiale chez des rats mâles et femelles jeunes, âgés de 2 mois stressés ou non périnatalement. Ces études comportementales accompagnées de mesures biologiques du métabolisme (glucose, mesure d'hormones du stress) et de prélèvements de structures cérébrales seront effectuées à la fin du traitement à l'alcool.

- La seconde partie concernera l'effet à moyen et long terme de l'éthanol au cours de l'adolescence chez des animaux adultes âgés de 5 mois ainsi que d'animaux âgés (22-24 mois). Les mêmes études précisées ci-avant seront réalisées.

- La troisième partie sera comparable à la seconde, mais une partie des rats mâles et femelles, stressés ou non sera traité à l'âge adulte par la carbétocine, agoniste des récepteurs à l'ocytocine. Les effets de cet analogue chez des rats stressés ou non périnatalement et exposés à l'alcool pendant l'adolescence seront testés en étudiant les mêmes paramètres présentés précédemment (comportement, métabolisme, épigénétique, prélèvement de structures cérébrales).

En plus des femelles utilisées pour la reproduction (n=90) et de 45 mâles reproducteurs, nous estimons que pour mener à bien les expériences proposées 240 adultes mâles et 240 femelles, nés pour la moitié de femelles gestantes stressées, seront utilisés, l'autre moitié provenant de femelles non stressées durant la gestation, soit un nombre final de 480 animaux, mâles et femelles confondus. Un nombre total de 615 animaux sera utilisé.

Ce projet est conçu dans l'optique de respecter scrupuleusement la règle des 3 R

- Principe de remplacement Aucune méthode alternative ou de substitution permet de recréer les conditions exposées ci-dessus, car il s'agit de mesurer des éléments intégrés associant stress périnatal et vulnérabilité au cours de l'adolescence.

- Principe de réduction 12 rats/groupe/sexe sont nécessaires pour limiter la variabilité interindividuelle des réponses au stress et des traitements à l'alcool.

- Principe de raffinement Les animaux seront nourris ad libitum avec accès libre à l'eau de boisson. Les rats, que ce soit lors de la période de reproduction ou lors des traitements, seront surveillés plusieurs fois par jours afin d'évaluer la présence de signes cliniques (vigilance des animaux, signes de détresse/douleur, perte de poids). Si un animal devait présenter des signes cliniques de détresse au cours d'une expérimentation, celui-ci serait rapidement euthanasié. Les animaux seront hébergés dans un endroit calme et toute expérimentation sera réalisée dans une salle différente de la salle d'hébergement.

Enfin, le personnel habilité réalisera l'ensemble du projet.

14835 La maladie d'Alzheimer, découverte en 1907 par Aloïs Alzheimer, est une pathologie neurodégénérative chronique, induisant la forme la plus commune des démences. Elle est caractérisée notamment par d'importants troubles de la mémoire et l'apraxie (la difficulté à réaliser des gestes quotidiens), mais aussi divers troubles du comportement tels que l'agressivité. Elle résulte de la mort progressive des cellules nerveuses, suite à une accumulation de protéines anormales dans le cerveau, qui n'est pas une conséquence du processus normal du vieillissement. Plus de 47,5 millions de personnes dans le monde sont atteintes de démence, et 60 à 70% des cas impliquent la maladie d'Alzheimer, faisant de cette pathologie la première maladie neurodégénérative au monde. La France fait partie des pays les plus touchés avec plus de 850 000 personnes atteintes de la maladie et 225 000 nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année. Ces chiffres pourraient doubler tous les 20 ans.

De nos jours, il n'existe aucun traitement permettant de guérir ou de ralentir l'évolution de la maladie d'Alzheimer. Les thérapies pharmacologiques ne traitent que certains symptômes de la maladie et sont considérées comme insuffisantes par le ministère de la santé, ce qui a conduit à leur déremboursement.

Il est donc indispensable de développer une nouvelle thérapie, curative, afin de ralentir voire de stopper le processus dégénératif. Dans ce cadre, il est intéressant de porter un intérêt particulier à plusieurs études récentes qui soulignent les potentiels mécanismes de neuroprotection induits par de la lumière. C'est le but de notre projet expérimental que nous souhaitons mener en quatre phases

- Importation du modèle de la maladie d'Alzheimer (basé sur l'injection de streptozotocine à des souris) dans notre laboratoire et caractérisation (études comportementales et imagerie).
- Le deuxième volet de notre projet a pour but d'évaluer le potentiel neuroprotecteur de la lumière sur ce modèle animal existant et bien établi de la maladie d'Alzheimer.
- Notre troisième objectif est de définir le type d'illumination le plus efficace dans le traitement de la maladie d'Alzheimer.
- Enfin, notre quatrième objectif est d'explorer les potentiels mécanismes de neuroprotection induits par cette lumière afin d'optimiser le traitement de la maladie d'Alzheimer.

L'étude se fera en comparant des animaux contrôles à des animaux exprimant les symptômes de la maladie d'Alzheimer, animaux qui seront ou non exposés à une illumination, et nécessitera l'utilisation de 840 souris au maximum, provenant d'élevages autorisés, afin d'assurer la validité des expériences menées.

Nous mènerons nos études dans le respect de la règle des 3R.

Remplacer Il n'existe pas de modèle non biologique ou *in vitro* permettant de réaliser ces travaux sans perte d'informations scientifiques.

Réduire Le nombre d'animaux pourra être réduit jusqu'à 50% dans certaines procédures si l'effet attendu est suffisamment important pour obtenir des résultats statistiquement fiables avec la première moitié d'animaux ou si les données se révèlent non pertinentes (arrêt alors des expérimentations).

Raffiner Les souris seront hébergées à l'animalerie en groupe sociaux, dans un environnement enrichi adapté à leur espèce. De plus, toutes les procédures réalisées sur les animaux vigiles (illumination et tests comportementaux) sont indolores et seront effectuées par des personnes expérimentées et formées. Les séances d'imagerie des animaux se feront sous anesthésie générale gazeuse, ils seront placés sur un tapis chauffant pour maintenir leur température et un gel ophtalmique sera appliqué pour éviter leur inconfort. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et tout sera mis en œuvre pour que les animaux aient un niveau d'inconfort aussi limité que possible. En cas d'effets inattendus, de perte importante de poids ou d'observation d'un phénomène douloureux, le vétérinaire en charge du bien-être des animaux sera immédiatement alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider de l'interruption de l'expérimentation.

14836 L'une des problématiques majeures en thérapie génique est le nombre limité de systèmes de vectorisation (véhicules moléculaire) suffisamment efficace pour délivrer des acides nucléiques médicaments dans des tissus pathologiques *in vivo*. Ce projet consiste à évaluer, l'efficacité de transfert de gènes médicaments et leur localisation dans le corps entier des souris par imagerie moléculaire. Cette étape est indispensable avant de pouvoir évaluer par la suite l'efficacité thérapeutique de ces véhicules moléculaire dans des modèles de cancer. Deux modèles murins de cancer de la peau (mélanome) et du sein (carcinome mammaire) seront utilisés pour cette étape de validation finale. L'intérêt de valider notre approche dans deux modèles de cancer différents est justifié par la directive 2009/120/EC publié par l'ANSM (Agence National de Sécurité du Médicament,) qui préconise la validation d'efficacité des systèmes de vectorisation (véhicules moléculaires) sur au moins deux types de cancer d'origine tissulaire différents avant d'envisager des études précliniques plus poussées. Différentes modalités d'administrations (injection intraveineuse, intramusculaire, péritonéale, intratrachéale et hydrodynamique) seront testées ainsi que différentes doses et cinétiques d'administration des véhicules moléculaires complexés avec les gènes médicaments. Nous évaluerons l'efficacité de 8 véhicules moléculaires en cours de développement au laboratoire. Etant donné la complexité des systèmes physiologiques mis en jeu dans un organisme entier, aucune alternative réaliste n'est actuellement disponible pour permettre

de réaliser ce type d'étude *in vitro*. Ce projet sera réalisé sur une durée de 5 ans, justifié par le temps requis pour la conception et la synthèse des véhicules moléculaires qui entreront dans cette étude. Les dommages attendus sont liés au développement de tumeurs (gène à la locomotion principalement) et nous avons mis en place une grille de suivi et des points limites prédictifs permettant d'anticiper l'apparition de toute gêne ou douleur liée au développement de la tumeur. Ce projet impliquera l'utilisation de 1410 souris, justifié par les différentes étapes que nous mettrons en place pour évaluer (1) l'efficacité du transfert des gènes médicaments, (2) localiser les tissus dans lesquels le transfert de ces gènes médicament a pris place à l'échelle de l'organisme des souris, (3) réaliser des tests d'innocuité tissulaire jusqu'à (4) l'évaluation thérapeutique finale dans deux modèles murin de cancer. Ce projet sera réalisé en conformité avec la règle des 3R et en limitant au maximum la souffrance des animaux. Nous suivrons au quotidien les souris pour réaliser une analyse comportementale ce qui nous permettra de suivre objectivement le bien être des animaux aux cours des différentes étapes de ce projet. Nous possédons également le savoir-faire et l'expertise technique pour ce type d'étude ce qui nous permet de réduire l'utilisation du nombre d'animaux à leur strict minimum sans compromettre pour autant les études statistiques. Enfin nous avons basé notre étude sur les procédés d'imagerie, non invasive, qui ne nécessitent aucun sacrifice des animaux pour récolter les données recherchées. Cette approche nous permet de réduire de façon également très significatif le nombre d'animaux nécessaire pour réaliser cette étude.

14837 La consommation excessive de nourriture apparaît préoccupante puisqu'elle peut devenir la cause de maladies comme l'obésité. Les activations cérébrales et les adaptations comportementales associées aux troubles de l'alimentation pourraient partager des similitudes avec celles mises en place dans l'addiction. En particulier, l'apparition de douleur chez des patients souffrant d'addiction à l'alcool a été décrite. Nous faisons l'hypothèse que les troubles de l'alimentation pourraient jouer un rôle dans le développement de douleur, et que les mécanismes sous-jacents impliqueraient le développement d'une neuroinflammation. Pour étudier ces mécanismes au niveau physiologique et moléculaires, nous proposons d'utiliser deux modèles de consommation excessive de sucre ou d'alcool et (1) d'évaluer les conséquences au niveau de la sensibilité nociceptive (mécanique et thermique) et (2) au niveau de marqueurs de la neuroinflammation, dans des régions du cerveau impliquées dans la récompense.

En identifiant les mécanismes physiologiques, notre recherche permettra d'améliorer la compréhension des mécanismes centraux impliqués dans les troubles alimentaires et dans l'addiction en général.

Remplacement Dans la mesure où nos travaux portent sur la caractérisation comportementale et moléculaire d'une consommation excessive d'aliment ou d'alcool, il n'est pas possible de recourir à un autre type de modèle d'étude qu'à celui de l'animal entier. Nous avons choisi la souris pour pouvoir plus tard étudier des modèles génétiquement modifiés. Raffinement : La surveillance des animaux est journalière (observation visuelle, suivi de l'aspect général et de la posture) et une pesée quotidienne est réalisée lors du suivi des consommations (sucre ou alcool), permettant de s'assurer du bien-être des souris. Les animaux ont toujours le choix de consommation (sucre ou alcool) avec de l'eau. Les souris, habituées au dispositif expérimental avant le début des mesures, peuvent se soustraire à la stimulation nociceptive. Un point limite est fixé pour chaque test nociceptif utilisé au-delà duquel la stimulation nociceptive est arrêtée en absence d'une réaction de l'animal. Réduction : Nous avons réduit au strict nécessaire le nombre d'animaux pour permettre des analyses statistiques, soit 12 souris/groupe pour le comportement. Les expériences seront menées sur les deux sexes. Dans ce contexte, nous anticipons que ce projet nécessitera au total 288 souris maximum.

14838 Le but de ce projet est de former, entraîner ou ré-entraîner les utilisateurs à la réalisation et la maîtrise de divers gestes d'administration et de prélèvement chez le rat et la souris. Cette formation est destinée aux concepteurs et aux personnels appliquant les procédures expérimentales. Les différentes voies d'administration seront : injection SC (sous-cutanée), injection IM (intra-

musculaire), injection IP (intrapéritonéale), injection IV (intraveineuse dans la veine latérale de la queue et dans le sinus rétro-orbital), gavage, injection intrathécale, injection intra-articulaire. Les différentes méthodes de prélèvement sanguin seront Prélèvement de sang au niveau du sinus rétro orbital, de la submandibulaire et de la veine latérale de la queue.

Conformité/exigences de remplacement, de réduction et de raffinement

Le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum tout en permettant la répétition des actes expérimentaux dans le respect des volumes tolérés pour chaque utilisateur. Pendant toute la période précédant la mise en oeuvre du projet, les animaux auront reçu un enrichissement adapté (papier accordéon et tunnel). Les animaux seront anesthésiés (générale + locale), analgésiés (analgésiques centraux) et mis sur tapis chauffants. Cependant, les administrations d'une solution de serum physiologique par voie IV (veine de la queue), voie orale (gavage), voie sous-cutanée et voie intrapéritonéale pourront être pratiquées sur animaux vigiles et dans le cadre d'une procédure de classe légère.

Le nombre total d'animaux utilisés sera de 200 souris et 200 rats maximum sur la totalité du projet.

14839 Les plaquettes sanguines sont les principaux acteurs de l'hémostase, processus physiologique permettant l'arrêt des saignements. Elles naissent dans la moelle osseuse et adoptent, une fois dans la circulation sanguine, une morphologie caractéristique en forme de disque dont le maintien dépend d'un anneau sous-membranaire de microtubules appelé bande marginale (BM). Les microtubules sont constitués de nombreuses protéines appelées tubulines qui, si elles sont absentes ou mutées, peuvent conduire à des pathologies plaquettaires chez l'Homme. Typiquement, les pathologies liées aux tubulines se caractérisent par des défauts d'assemblage de la BM et se répercutent sur la qualité et la quantité des plaquettes circulantes dans le sang. En effet, les plaquettes perdent leur forme discoïde au profit d'une forme sphérique, plus volumineuse, et sont généralement deux à trois fois moins nombreuses que la normale. L'objectif de notre projet scientifique consiste à 1) étudier le rôle des différentes tubulines dans l'assemblage de la BM et 2) évaluer leur importance dans les fonctions plaquettaires et l'hémostase.

Les résultats obtenus à l'issue de l'objectif 1 présagent un rôle majeur pour deux tubulines dans les fonctions plaquettaires et l'hémostase. En effet, les souris n'exprimant plus ces deux tubulines (DKO) présentent une forte tendance hémorragique. Dans le cadre de l'objectif 2) de notre projet, nous souhaitons débiter des expérimentations visant à caractériser les processus hémostatiques de ces souris à l'aide d'expériences de greffe de moelle osseuse suivies d'un test de « temps de saignement » et de thrombose. Elles nous permettront d'évaluer le rôle et la part imputable aux plaquettes dans le saignement des souris DKO.

Nous sommes conscients que les procédures sont toutes terminales et lourdes pour l'animal, mais nous serons très attentifs à respecter les règles des trois R afin de limiter les souffrances et le nombre d'animaux utilisés, ceci dans un souci constant d'amélioration des conditions de vie et d'expérimentation. A terme, les bénéfices attendus visent à améliorer le diagnostic et le traitement des patients atteints de maladies plaquettaires.

Réduction : Les expériences de greffe de moelle osseuse sont déjà maîtrisées au laboratoire, de même qu'elles sont déjà décrites et publiées dans la littérature. Elles permettent d'obtenir des animaux « chimère » tout en s'affranchissant de la création de lignées transgéniques et donc de réduire considérablement le nombre d'animaux. Le nombre d'animaux est défini au plus près afin d'obtenir une analyse statistique fiable des données.

Raffinement : Une attention particulière est portée au bien-être des animaux afin de diminuer le stress et la douleur. Les conditions d'environnement sont optimisées par l'enrichissement des cages avec des carrés de cellulose et de la frisure de papier ce qui leur permet de compartimenter leur environnement selon leurs besoins. Les animaux entre 2 et 6 par cage, ont un accès permanent à l'eau de boisson et à la nourriture. Les procédures douloureuses seront réalisées sous anesthésie et analgésie appropriées avec maintien de la température de l'animal pendant l'anesthésie. Elles seront toujours exécutées par du personnel formé.

Remplacement : Le phénomène de saignement repose sur une multitude de facteurs (plaquettes, vaisseaux sanguins...). Il n'est à ce titre pas possible de le modéliser ou de le reproduire *in vitro*. Les cellules de moelle osseuse ne pouvant pas être produites et maintenues *in vitro*, elles devront impérativement être préparées et isolées des os de souris extemporanément.

Un total de 128 souris sera nécessaire pour mener à bien ce projet.

14840 Chez l'homme, la douleur neuropathique est très hétérogène : elle reflète des signes et des symptômes différents dues à des pathologies très diverses. La prédominance des modèles de neuropathies traumatiques ne reflète pas la réalité clinique. La translation de la clinique vers les modèles animaux est très difficile tant dans l'approche des modèles physiopathologiques que dans les stimuli utilisés pour révéler l'hyperalgésie ou l'allodynie (stimuli thermiques, mécaniques, chimiques). Sur le plan pharmacologique, la douleur neuropathique répond mal aux antalgiques classiques (Gapabentine et Morphine) d'où le besoin de mise au point de nouvelles molécules.

Dans le cadre de ce projet, nous souhaitons mettre en place un modèle de neuropathie chimio-induite à l'oxaliplatine chez le rat. Le but sera ensuite d'évaluer l'allodynie par un test d'immersion à 10°C. Dans un second temps, nous reverserons l'effet avec un antalgique classique afin de valider notre modèle.

Nos activités s'inscrivent dans le respect de la règle des « 3R » pour l'expérimentation animale. Notre activité permet de raffiner en proposant des modèles *in vivo* toujours plus proches des situations cliniques (induction de pathologies, mesures des composantes multiples de la douleur). Le raffinement passe également par la réduction autant que possible de la souffrance et du stress des animaux et l'amélioration de leur bien-être (enrichissement et paramètres environnementaux contrôlés tout au long de l'étude).

Enfin, pour chaque étude, le nombre d'animaux utilisés est réduit à un minimum acceptable pour l'obtention d'informations robustes et statistiquement pertinentes. Le nombre d'animaux utilisés pour cela est estimé à 460 sur un an.

14841 Les cellules cancéreuses envoient des signaux aux autres cellules du corps, en particulier par le moyen de petites vésicules contenant de nombreuses informations. Il existe une grande variété de vésicules, certaines semblent aider le cancer à se développer en empêchant le système immunitaire de reconnaître le cancer, alors que d'autres semblent aider l'organisme et son système immunitaire à se débarrasser du cancer. Il est nécessaire de comprendre quelles vésicules renferment l'activité anti-tumorale et quelles vésicules contiennent l'activité pro-tumorale, afin de pouvoir créer de nouveaux traitements anti-cancéreux qui viseraient à éliminer spécifiquement les « mauvaises » vésicules.

Pour répondre à cette question, nous allons regarder comment, dans une souris, les différentes vésicules envoyées par une cellule tumorale entrent en contact avec les cellules du système immunitaire, et comment elles affectent leurs fonctions.

Ainsi, des cellules tumorales produisant des vésicules marquées par une protéine fluorescente ou contenant un antigène seront greffées dans des souris. Quelques jours à quelques semaines après la tumeur et les ganglions drainants seront analysés. La capture et le « processing » des vésicules par les cellules immunitaires sera analysée par visualisation des protéines fluorescentes et par l'étude de la réponse immune spécifique de l'antigène. Dans un deuxième temps, nous isolerons ces cellules immunitaires afin de déterminer plus en détails les modifications de leurs fonctions lorsqu'elles ont rencontré les différents types de vésicules.

Au préalable, différentes expériences ont été réalisées *in vitro* afin de réduire le nombre d'animaux utilisés. De plus, ni les modélisations mathématiques, ni les systèmes *in vitro* ne permettent de reproduire le contexte global de la croissance tumorale. Il est donc nécessaire de mener ce projet dans l'animal vivant, ici la souris qui est le modèle animal le plus probant. Pour l'ensemble du projet, le nombre de souris nécessaires faisant l'objet de la présente demande sera de 2608 souris.

En accord avec les recommandations internationales dans le domaine de la cancérologie, les animaux seront hébergés dans un environnement enrichi et suivis quotidiennement afin d'assurer

leur bien-être. Lorsque cela est nécessaire des méthodes pour réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et l'anxiété des animaux seront utilisées. Les expérimentations seront arrêtées avant la souffrance des animaux selon des points limites listés dans une grille de score. Toutes les précautions seront prises pour réduire le nombre d'animaux utilisés, tout en assurant une valeur significative des résultats obtenus. Chaque animal sera utilisé pour analyser plusieurs paramètres des cellules du système immunitaire et de la tumeur, ce qui permettra d'optimiser les données obtenues sur chaque animal.

14842 Dans l'industrie électro-nucléaire, la manipulation par des travailleurs d'éléments radioactifs comme le cobalt ou les actinides, émetteurs de rayonnements alpha tels le plutonium ou l'américium ou l'uranium, constitue un risque de contamination interne. Bien que peu d'accidents de contamination interne surviennent chaque année, l'approche médicale actuelle vise à limiter la dose radiologique délivrée aux tissus de l'organisme. Depuis de nombreuses années, notre laboratoire étudie la radiotoxicité de ces éléments, essentiellement chez le rongeur. La mise au point d'un traitement consiste à stimuler la décorporation (évacuation du corps) de ces éléments en traitant la personne contaminée avec un agent chélateur DTPA (acide diéthylène triamine penta acétique), seule molécule recommandée et disposant de l'AMM (autorisation de mise sur le marché) à ce jour. Cette approche thérapeutique vise à limiter la rétention de l'actinide et à augmenter son excrétion. Malheureusement, cet agent décorporant présente une efficacité limitée liée notamment à sa période biologique courte et sa biodisponibilité intracellulaire faible. L'efficacité de décorporation par le DTPA pourrait être améliorée par une nouvelle forme galénique pour qu'il cible préférentiellement les principaux tissus de rétention des actinides, et/ou pour prolonger sa période biologique, ou par la combinaison du DTPA avec d'autres agents pharmacologiques comme le par exemple le bicarbonate de sodium. En plus de cette approche « décorporant », nous allons également étudier les effets physiopathologiques induits par une contamination pulmonaire par le plutonium moyennement soluble.

Nos études permettront de définir des protocoles de traitements décorporants par le DTPA plus efficaces et adaptés aux scénarios de contamination interne pour les travailleurs du nucléaire. Ils permettront également de déterminer le bénéfice d'autres traitements combinés au DTPA.

Ce projet ne peut pas être réalisé sur des modèles cellulaires, les actinides étant retenus par différents organes cibles (os, foie). De plus, la rétention peut varier selon la nature physico-chimique du contaminant et des approches thérapeutiques choisies.

Ce projet utilisera 1164 rongeurs, espèce pour laquelle le laboratoire possède de nombreuses données expérimentales après contamination par des actinides (métaux lourds appartenant à une série de 15 espèces chimiques tous radioactifs) ou du cobalt, ce qui nous permet de faire des comparaisons et de limiter au maximum le nombre d'animaux nécessaire. Ce nombre a été calculé au plus juste et déterminé en fonction des quatre procédures expérimentales de traitement à tester pour quatre contaminants différents (plutonium sous la forme soluble, moyennement soluble, ou colloïdale, et américium) et cobalt. Tous les animaux proviennent d'élevages agréés et prévus pour l'expérimentation.

Les modes opératoires de cette étude ont été réfléchis de manière à engendrer le moins de souffrance possible aux animaux. Toutes les injections sont faites sous anesthésie. L'observation quotidienne des animaux par les zootechniciens mais aussi par les expérimentateurs permet d'administrer des traitements antalgiques adaptés dès la survenue de problèmes.

Pour pallier des effets non attendus, des critères d'arrêt ont été prévus. Une attention particulière est portée sur la mise en place d'un enrichissement adapté, dans la cage d'hébergement des animaux de façon à améliorer leur cadre de vie tout au long de l'étude.

14843 Ce projet de recherche a pour objectif d'étudier la contamination des plumes, et des produits dérivés (farine), par les résidus antibiotiques en élevage avicole. Dans ce projet les niveaux d'exposition et les risques induits pour la chaîne alimentaire et l'environnement, seront particulièrement étudiés et nécessite la réalisation d'une expérimentation animale.

Contrairement aux denrées alimentaires produites par les animaux de rente, les sous-produits (par exemple, les plumes) destinés à la fabrication de produits dérivés (par exemple, la farine de plume) ne sont pas soumis à des limites réglementaires ni à des interdictions concernant la présence de résidus d'antibiotiques pouvant faire suite aux traitements vétérinaires administrés aux animaux. Les plumes sont pour partie réintroduites dans la chaîne alimentaire animale et de l'environnement. Riches en matière azotée, elles sont transformées en produits dérivés (farines) pour l'alimentation animale (petfood ou piscicole) ou bien directement incorporées dans la fabrication d'engrais. Les plumes et les farines de plumes pourraient donc constituer un réservoir potentiel de résidus d'antibiotiques exposant de manière involontaire l'environnement et les poissons via l'alimentation, et risquant alors de contribuer à l'émergence de l'antibiorésistance. Pourtant, les quelques études rapportées dans la littérature font état de la présence de résidus d'antibiotiques dans la plume à des teneurs pouvant dépasser les teneurs maximales autorisées ou Limites Maximales Résiduelles fixées pour les denrées alimentaires. En outre, la rémanence de ces résidus mesurée dans la plume semble généralement plus longue et plus stable que dans les denrées alimentaires. Les données scientifiques concernant les résidus dans les plumes sont encore insuffisantes, particulièrement en France et seule une étude américaine révèle la présence de dix résidus d'antibiotiques dans des farines de plumes de diverses provenances, et ce malgré les procédés mis en œuvre pour produire la farine.

Pour réaliser ce projet deux procédures sont nécessaires une procédure pilote permettant d'établir la procédure principale. Les objectifs à atteindre sont (i) évaluer la distribution des résidus antibiotiques étudiés (amoxicilline, sulfadiazine, triméthoprime et tétracycline) dans les plumes de volaille adultes préalablement traités par ces antibiotiques à des doses thérapeutiques (ii) évaluer le développement de l'antibiorésistance de souches bactériennes au travers des fientes des poulets traités et non traités ainsi que sur les plumes contaminées ou non par les fientes.

L'expérimentation animale se déroulera de façon longitudinale tout au long du projet sur des poulets de chair âgés de 3-4 semaines. Quelques plumes (1 gramme soit environ 10 plumes) seront prélevées à différents intervalles ainsi que du sang (1 ml). Cette étude est menée spécifiquement afin d'évaluer la contamination des plumes par les résidus antibiotiques. Il n'existe pas de modèle expérimental alternatif. L'utilisation animale ne peut donc être évitée. Le nombre d'animaux est calculé de manière à obtenir la quantité suffisante de plumes, de sang et de fientes respectivement 8 et 29 animaux seront inclus dans la procédure pilote et la procédure principale pour un total de 37 animaux. Les procédures expérimentales sont conçues pour limiter autant que possible la souffrance animale, en limitant les interventions sur animaux. Les poulets seront logés dans des box ou des cages si nécessaire, en respectant les normes du bien-être animal et avec à disposition des enrichissements appropriés.

14844 La dystrophie musculaire oculo-pharyngée (DMOP) est une myopathie progressive survenant chez l'adulte, caractérisée par un affaissement progressif des paupières par faiblesse musculaire, des difficultés à avaler, des troubles de la parole et une faiblesse des muscles des hanches et des cuisses. Il s'agit d'une maladie monogénique rare, autosomique dominante dont la prévalence est estimée à 15 000 patients dans les pays occidentaux. La DMOP est causée par une expansion du domaine poly-alanine dans le gène PABPN1, ce qui conduit à une surexpression d'une protéine mutante et par conséquent, à l'accumulation d'agrégats nucléaires dans les muscles. Actuellement, il n'existe pas de traitement pharmacologique disponible, seuls des traitements chirurgicaux sont proposés pour essayer de soulager l'affaissement des paupières et les difficultés de déglutition. Habituellement, l'espérance de vie n'est pas réduite, mais la qualité de vie peut l'être en cas de maladie invalidante. L'issue fatale observée chez des patients âgés est généralement due à une pneumonie d'aspiration ou une malnutrition (perte de poids sévère).

La thérapie génique fait partie des approches thérapeutiques envisageables pour cette pathologie chez l'homme ou pour le maintien ou l'amélioration de la fonction musculaire. En particulier, la vectorisation d'un transgène thérapeutique grâce à un vecteur adéno-associé recombinant (AAVr) est une approche très prometteuse puisque ces vecteurs permettent un transfert de gène efficace dans les muscles. La stratégie thérapeutique envisagée dans le cadre de l'étude présentée ici vise

à traiter la dysphagie associée à la DMOP. Il s'agit d'une stratégie thérapeutique unique visant à la fois à inhiber le gène mutant PABPN1 responsable de la maladie et à réintroduire simultanément le gène PABPN1 normal via le même vecteur afin de restaurer la fonction musculaire au niveau des muscles de la région pharyngée.

Le but de notre étude est d'optimiser, chez le chien, le mode d'administration (injection intramusculaire) de ce produit thérapeutique au niveau des muscles de la gorge (plus précisément au niveau de 4 muscles du pharynx), et de déterminer la dose permettant de transduire l'intégralité de ces muscles. Nous incluons 28 chiens au cours de cette étude qui se déroulera en deux temps

1) Détermination du volume maximal pouvant être injecté par voie intramusculaire au niveau des muscles de la gorge 2 chiens

2) Détermination de la dose optimale du produit thérapeutique à injecter (en jouant sur la concentration du vecteur et le volume administré) pour transduire de façon complète les 4 muscles de la gorge ciblés 8 groupes de 3 à 4 animaux. Cette partie de l'étude servira également à mesurer l'impact de (i) l'opérateur et (ii) du traitement immunomodulateur sur l'efficacité de transduction.

L'application de la règle des 3R au cours de ce projet sera effectuée comme suit

REDUCTION - Pour la détermination du volume maximal pouvant être injecté au niveau des 4 muscles de la gorge ciblée, 2 chiens seront utilisés, afin de pouvoir tester plusieurs volumes d'injection dans chaque muscle. Plusieurs muscles et plusieurs volumes seront testés par chien, afin d'optimiser les informations recueillies et d'affiner les volumes à injecter dans la 2ème partie de l'étude. Deux chiens seront inclus, afin d'augmenter la robustesse de ces tests et les conclusions qui en seront tirées.

- Pour la détermination de la dose optimale du produit thérapeutique à injecter (en jouant sur la concentration du vecteur et le volume administré) pour transduire de façon complète les 4 muscles de la gorge ciblés 26 chiens seront inclus en 8 groupes de 3 à 4 animaux. Chaque chien étant injecté dans plusieurs muscles et via plusieurs points d'injection, cela permettra d'obtenir un nombre significatif de données pour chaque groupe expérimental. Ces données seront comparées via un test statistique de type ANOVA ou Kruskal-Wallis, selon la normalité de leur répartition.

RAFFINEMENT : 1) de bonnes conditions d'hébergement selon la réglementation en vigueur avec enrichissement du milieu (hébergement à deux individus minimum si possible, jeux type balle mis à disposition, séances de socialisation régulières, sorties régulières et planifiées dans des couloirs de jeux...)

2) un suivi régulier des animaux (observations biquotidiennes, pesées régulières, analyse du comportement)

3) l'instauration de points limites pertinents et la mise en place de mesures adaptées si nécessaire (anesthésies, traitements analgésiques par utilisation de buprénorphine notamment ou euthanasie si pas d'autre alternative)

4) la mise en place de mesures adaptées en fonction des interventions prévues au cours de cette étude et notamment chirurgicales anesthésie et analgésie adaptées par le biais de la mise en place d'une anesthésie générale associant l'acépromazine, le diazépam et le Propofol avant intubation et relai gazeux à l'isoflurane, associée à une analgésie pour limiter une éventuelle douleur chirurgicale buprénorphine ou Morphine en pré et per opératoire. La mise à mort des animaux en fin d'étude se déroulera par injection intraveineuse létale de Pentobarbital.

REMPLACEMENT : Le remplacement d'animaux ne sera pas possible dans cette étude, car il n'existe pas aujourd'hui de méthode alternative pour tester l'effet d'un traitement de thérapie génique *in vivo*. L'animal est le seul organisme vivant permettant d'étudier l'impact d'un transfert de gène dans différents types cellulaires (différents organes) et sur son phénotype, en lien avec le produit testé, le mode d'administration utilisé et la dose. D'autre part, l'espèce chien a été choisie du fait que (i) les dimensions des muscles à traiter sont similaires à ceux des humains, (ii) que l'approche chirurgicale des muscles de la gorge chez le chien est assez courante et très similaire à l'approche chirurgicale à effectuer chez les patients, et (iii) qu'il existe une quantité importante de

données toxicologiques et anatomiques historiques qui contribueront à étayer les résultats de notre étude.

14845 La concentration anormalement élevée en triglycérides circulants dans le sang après un repas (hypertriglycéridémie postprandiale) est un facteur de risque cardiovasculaire reconnu. Il est donc important de mieux appréhender les mécanismes d'absorption intestinale des lipides. De récents résultats sur des souris transgéniques ont montré que certaines protéines intestinales de la classe des "récepteur scavengers" sont importantes dans la régulation de la triglycéridémie après gavage d'huile en présence de cholestérol. La triglycéridémie postprandiale reste plus haute et plus longtemps chez les souris déficientes pour le récepteur scavenger par rapport à leur contrôle non génétiquement modifié.

Afin de reproduire ces résultats sur des souris non transgéniques, nous utiliserons un traitement avec une molécule utilisée en médecine humaine capable d'induire une hypertriglycéridémie (traitement hyperlipémiant). La souche de souris utilisée sera la souche C57Bl6/j, qui est actuellement la plus utilisée au monde pour la recherche en médecine humaine. Pour cette étude, il est nécessaire que les intestins des animaux soient vides. Les souris seront donc mises à jeun pendant une nuit. Le matin, le traitement hyperlipémiant ou un placebo sont injectés, puis une goutte de sang est prélevée toutes les heures, pendant 5 heures. A la fin de la procédure, une prise de sang est effectuée, et les animaux sont euthanasiés afin de prélever le foie et l'intestin. Ce protocole induit un stress particulier lors de la mise à jeun, qui ne peut être évité. Les résultats attendus seront utiles en recherche biomédicale, en décrivant les interactions entre le foie et l'intestin lors de l'hypertriglycéridémie postprandiale.

L'utilisation de modèles *in vitro* n'est pas envisageable, car il est nécessaire d'avoir un organisme entier pour étudier le dialogue inter-organes. Les souris étant très proches génétiquement, et étant donné les connaissances déjà publiées sur un protocole similaire effectué sur des souris transgéniques, 12 souris mâles seront suffisantes pour mener cette étude.

Les souris seront commandées auprès d'une entreprise d'élevage agréée, et arriveront dans l'animalerie du laboratoire (température de 21°C, cycle jour / nuit de 12h / 12h) une semaine avant le début des procédures. Elles seront hébergées par 6 dans des cages en plastique de 530 cm² contenant de la litière, de l'aliment pour rongeur de laboratoire, de l'eau ad libitum et un enrichissement sous forme de maisonnettes en inox et de bâtonnets de bois. Durant toute la durée de leur séjour, les souris seront observées quotidiennement par du personnel qualifié qui veillera à leur bien-être. Les animaux seront endormis par un gaz narcotique pour l'injection du traitement, et une anesthésie locale sera pratiquée pour le prélèvement de la goutte de sang à la queue.

14846 L'étude décrite dans le présent dossier sera réalisée dans le cadre du développement d'une série de 6 composés en développement, de type probiotiques, destinés à l'amélioration des troubles métaboliques, notamment l'obésité.

L'objectif de la présente étude sera d'évaluer l'impact de ces composés sur la prise alimentaire, le poids corporel et la régulation glycémique chez des souris rendues obèses par un régime hyperlipidique (45% de l'énergie issue des graisses) pendant 12 semaines. Le traitement sera administré par voie orale pendant les 12 semaines de régime (T1 à T86). Au cours du traitement, les paramètres suivants seront mesurés : poids corporel, prise alimentaire et composition corporelle. Six prélèvements sanguins de 100µl seront réalisés tout au long du traitement pour dosages biochimiques ultérieurs.

La présente étude nécessitera l'emploi de 120 souris C57Bl/6 réparties en 12 groupes expérimentaux de 10 animaux. L'ensemble des groupes sera nourri avec un régime enrichi en graisses (45% de l'énergie issue des graisses).

La règle des 3Rs a été prise en compte dans l'élaboration du présent protocole :

- Raffinement : Le modèle animal qui sera utilisé est un modèle parfaitement caractérisé dans la littérature et couramment utilisé dans les études précliniques cherchant à mettre en évidence les effets bénéfiques de composés sur la prise alimentaire, le poids corporel et les troubles

métaboliques. Le protocole a été planifié de façon à limiter au maximum tout stress et tout inconfort pour les animaux. Les animaux seront hébergés en cages collectives (2 à 3 souris/cage) et un enrichissement du milieu sera assuré par l'ajout d'igloos et de matériels de nidification. Enfin, un suivi journalier des animaux à l'aide d'une grille de score permettra une action rapide en cas d'atteinte des points limites établis.

- Réduction : Le nombre d'animaux utilisés a été rationalisé à partir de l'expérience acquise par notre laboratoire sur l'analyse des paramètres d'intérêt. Ainsi, le nombre d'animaux par groupe a été adapté pour chaque série expérimentale en fonction des paramètres d'intérêt de façon à être en mesure de mettre en évidence une différence statistiquement significative sur les paramètres étudiés.

- Remplacement : L'utilisation d'animaux à des fins scientifiques se justifie ici car il n'existe aucune méthode de substitution n'utilisant pas l'animal de laboratoire et permettant l'étude de l'impact d'un composé sur le poids corporel, la prise alimentaire et les troubles métaboliques.

14847 Les maladies auto-immunes et inflammatoires chroniques sont la troisième cause de décès dans les pays développés, après le cancer et les maladies cardiovasculaires et leur prévalence augmente.

Pour la plupart d'entre elles, on retrouve dans le sang des patients, des auto-anticorps sécrétés par une sous-population de cellules immunitaires. La compréhension des mécanismes entraînant l'activation de ces cellules, leur prolifération et leur migration est donc très importante. Dans ce projet, nous voulons tirer parti de la capacité de molécules inhibitrices de ces cellules immunitaires, libérées par des cellules cancéreuses. Ces molécules inhibitrices pourraient représenter de nouvelles options thérapeutiques indispensables dans le domaine des maladies inflammatoires chroniques.

Nous avons identifié un peptide d'intérêt, produit par une lignée de cellules cancéreuses, capable d'inhiber l'activation des cellules immunitaires et leur évolution en cellules sécrétrices d'anticorps. Sur la base de ces résultats préliminaires obtenus *in vitro*, nous proposons d'étudier *in vivo*, chez la souris, la fonction et le mécanisme d'action de ce peptide, ainsi que son potentiel thérapeutique pour le lupus érythémateux systémique.

Malgré des approches ex-vivo (prélèvements de patients lupiques) et *in vitro*, qui seront utilisées pour répondre à certaines questions spécifiques de ce projet, il n'y a pas d'alternative aux modèles animaux pour récapituler la complexité des interactions existant entre les différents acteurs cellulaires impliqués dans les maladies inflammatoires auto-immunes.

Afin de réaliser l'ensemble de nos expériences, 680 souris sont demandées sur une période de 5 ans, dans le respect de la règle des 3R.

Remplacer Des méthodologies de culture cellulaire et de modélisation ont été mises en place afin de remplacer au possible l'utilisation d'animaux pour répondre à certaines questions spécifiques de ce projet. Mais seul un modèle chez la souris permettra de caractériser la fonction et les mécanismes d'action dans sa globalité de ce peptide, de vérifier son innocuité, et son efficacité thérapeutique potentielle dans un modèle murin de lupus.

Réduire Pour nos expériences, nous avons prévu le nombre nécessaire et suffisant d'animaux, pour garder une puissance statistique dans le traitement des résultats et avoir le nombre de contrôles internes obligatoires.

Raffinement Le bien-être de nos animaux sera pris en compte (hébergement en cages collectives, enrichissement de l'environnement et points limites précoces adaptés) de leur naissance à leur mort afin d'éliminer ou de réduire au minimum toute douleur, souffrance, angoisse et tout dommage durable susceptible d'être infligé à ceux-ci.

14848 Chez le chien, l'amoxicilline est un des antibiotiques les plus largement utilisés pour traiter les infections urinaires. Cependant, il est nécessaire pour préserver l'efficacité de cet antibiotique de mettre des stratégies en place pour éviter l'apparition de résistances bactériennes, la résistance

aux antibiotiques étant considéré comme un problème majeur de santé publique chez l'Homme comme chez l'animal.

L'amoxicilline étant un antibiotique de la famille des bêta-lactamines, sa structure contient des cycles bêta-lactame. Pour devenir résistantes aux bêta-lactamines, certaines bactéries sont capables de produire des enzymes, les bêta-lactamases, qui vont rendre ces antibiotiques inefficaces. Une des stratégies pour limiter l'apparition de résistances à l'amoxicilline est alors de l'associer à un inhibiteur de ces bêta-lactamases, l'acide clavulanique.

Cependant, pour qu'un effet thérapeutique acceptable soit atteint lors du traitement d'infections urinaires chez le chien tout en limitant l'apparition de résistances, il faudrait que les concentrations plasmatiques et urinaires en amoxicilline soient au-dessus de la concentration minimale en antibiotique suffisante pour inhiber la croissance des bactéries pathogènes et que les concentrations plasmatiques et urinaires en acide clavulanique soient suffisantes pour inhiber la production de bêta-lactamases par les bactéries potentiellement résistantes.

Or, il y a très peu de données concernant la pharmacocinétique de l'amoxicilline et de l'acide clavulanique chez le chien. Il est alors nécessaire de mieux caractériser la pharmacocinétique de l'amoxicilline et de l'acide clavulanique chez le chien afin d'optimiser les doses à administrer pour traiter efficacement les animaux.

Pour cela, 12 chiennes seront utilisées dans ce projet. Nous avons choisi des femelles car le traitement contre les infections urinaires est majoritairement mis en place chez la chienne. Elles recevront successivement une administration de l'association amoxicilline/acide clavulanique par voie orale (voie d'administration la plus utilisée par les propriétaires de chiens à domicile) et par voie intraveineuse (voie d'administration nécessaire à la détermination de la biodisponibilité de la molécule et voie d'administration utilisée en clinique lors d'une chirurgie ou dans les unités de soins intensifs). L'étude sera menée en cross-over, 6 chiennes recevant l'administration intraveineuse en premier et 6 chiennes recevant l'administration par voie orale en premier. De plus, afin de déterminer le taux d'excrétion urinaire de l'amoxicilline et de l'acide clavulanique, le débit de filtration glomérulaire nécessaire pour calculer ce taux sera déterminé pour chaque chien via l'administration intraveineuse d'une substance exogène totalement filtrée et non sécrétée ni réabsorbée par le rein, le iohexol. L'administration intraveineuse de iohexol sera effectuée juste après l'administration intraveineuse d'amoxicilline/acide clavulanique via le même cathéter placé dans une des veines céphaliques afin de réduire les manipulations et les prélèvements sur chaque chien.

Des prélèvements de sang et d'urine (miction spontanée après placement en cage à métabolisme) seront réalisés après chaque administration pour déterminer la cinétique plasmatique et urinaire de l'amoxicilline, de l'acide clavulanique et du iohexol après chaque traitement.

Il n'y a pas d'étude statistique de prévue à part la vérification d'une absence d'effet de la séquence des deux administrations car tous les chiens reçoivent le même traitement. Le nombre de 12 chiennes a été déterminé en prenant en compte la variabilité interindividuelle potentielle des concentrations plasmatiques et urinaires, notamment en ce qui concerne les concentrations en acide clavulanique qui sont plus variables que celles en amoxicilline.

Il n'est pas possible de se passer d'animaux pour ce projet car le devenir d'un médicament dans un organisme (pharmacocinétique) n'est pas prévisible par des études *in vitro* compte-tenu de la complexité des mécanismes (mécanismes d'absorption, métabolisme hépatique, diffusion tissulaire, élimination rénale,). Cependant, les études pharmacocinétiques menées ici afin de déterminer les paramètres pharmacocinétiques de la molécule seront réalisées sur chiens sains uniquement. Des données pharmacocinétiques et d'efficacité du traitement seront obtenues sur des chiens recrutés dans le service de soins intensifs d'un centre hospitalier vétérinaire. De plus, en considérant le développement rapide et inquiétant de la résistance aux antibiotiques et le risque important de l'absence future de traitement efficace contre certaines bactéries pathogènes, le rapport bénéfice/risque de l'étude semble justifier l'utilisation d'animaux dans ce projet.

En dehors des périodes de cinétiques, les chiens seront hébergés en groupe avec des jouets, des tablettes et des courettes extérieures. Lors des périodes de cinétiques, ils seront hébergés pendant une courte période dans des loges individuelles leur permettant de se voir et de se sentir entre eux.

Un contact humain régulier est prévu, notamment les jours de cinétique où il y a toujours au moins une personne en permanence avec les chiens.

Les prélèvements sanguins seront réalisés alternativement sur la jugulaire droite et la jugulaire gauche soit pas plus de 6 ponctions par cinétique par jugulaire avec une aiguille très fine (22G) par du personnel formé à la contention et aux prises de sang plus spécifiquement chez les carnivores domestiques (limitant le risque de devoir repiquer). La possibilité de doser les trois molécules (amoxicilline, acide clavulanique et iohexol) à partir d'un même échantillon de faible volume (maximum 2 mL par prélèvement) permet de réduire le nombre de prélèvements et le volume prélevé sur chaque chien.

Si un hématome se forme lors des prises de sang à la jugulaire, la veine ne sera plus prélevée jusqu'à résorption de l'hématome et on utilisera l'autre veine jugulaire. Des poches de glace préalablement réfrigérées permettront également de réduire la douleur en cas d'hématome. A la fin du projet, les chiens pourront être réutilisés pour un autre projet ou seront proposés à l'adoption.

14849 La protéine sur laquelle nous travaillons limite la croissance tumorale. Nous avons montré que des modulateurs positifs de cette protéine possède des propriétés anti tumorales transmises par les cellules immunitaires. De plus, en couplant nos molécules avec des immunothérapies nous avons réussi à guérir les souris porteuses de cancer.

Dans ce projet, nous souhaitons caractériser les mécanismes d'actions cellulaires et moléculaires de nos composés antitumoraux. Ceci nous permettra d'identifier d'une part les cellules immunitaires qui répondent aux modulateurs de notre protéine et d'autre part les voies de signalisations impliquées dans l'effet antitumoral.

Nous utiliserons des souris commerciales ou des souris transgéniques invalidées pour l'expression de protéines d'intérêts. Ces modèles animaux possèdent un système immunitaire fonctionnel et ne présentent aucun phénotype dommageable. Nous injecterons des cellules tumorales de souris en sous cutané dans un seul flanc, ce qui permet de suivre facilement la croissance tumorale. Nous évaluerons le rôle des cellules immunitaires et cytokines (lymphocytes T, Natural killer (NK), cellules dendritiques, macrophages, neutrophiles) en utilisant des techniques classiquement utilisées en immunologie. Ces approches impacteront la croissance des tumeurs (plus rapide si le traitement ne marche pas, et moins rapide s'il marche). Les différents traitements que nous allons faire vont générer une douleur modérée et nous avons établi une fiche d'observation qui prend en compte l'aspect physique, le suivi pondéral, la taille et l'aspect des tumeurs afin de limiter au maximum la souffrance des animaux.

Une fois les traitements réalisés, les animaux seront suivis quotidiennement et la fiche d'observation renseignée de façon à assurer une bonne gestion de la douleur, le tout en accord avec les objectifs de notre étude. L'ensemble de cette étude a été conçue pour respecter la règle des 3R.

REDUCTION : Une étude exhaustive de la littérature a été menée avant d'initier ce projet pour s'assurer de la non reproduction de résultats déjà publiés. Le nombre d'animaux utilisé lors des expériences a été calculé pour utiliser le minimum d'animaux tout en obtenant des résultats statistiquement significatifs.

RAFFINEMENT : Nos précédents résultats *in vitro* et *in vivo* ont démontré l'absence de toxicité de notre composé sur les animaux. Les procédures expérimentales peuvent engendrer une douleur modérée, pour limiter cette douleur, nous avons établi une grille d'observation visant à définir les points limites à partir desquels l'expérience sera arrêtée. Toutes ces mesures seront prises pour limiter au maximum la souffrance des animaux tout au long de l'expérimentation.

REMPACEMENT : Seul les modèles animaux permettent de tester la collaboration qui existe entre les différents compartiments cellulaires, en particulier les relations complexes entre le système immunitaire et les tumeurs. Ainsi la faisabilité et l'efficacité d'une nouvelle approche à visée thérapeutique ne peut se faire que chez l'animal. Dans ce cadre la souris est utilisée.

Pour caractériser les mécanismes d'action de nos composés antitumoraux nous aurons besoin au maximum de 2484 animaux.

14850 Les maladies cardiovasculaires sont responsables de 32% des décès dans le monde. La maladie des vaisseaux qui desservent le muscle cardiaque ou myocarde, les artères coronaires, représente la moitié des décès d'origine cardiovasculaire.

Elle se caractérise par un dépôt de lipides dans la paroi de ces artères, qui peut conduire, par obstacle à l'écoulement normal du flux sanguin, à l'angine de poitrine, voire à l'infarctus du myocarde. Cette atteinte des coronaires est aujourd'hui bien connue. Cependant celles-ci en se ramifiant pour irriguer le myocarde, se divisent en vaisseaux de plus en plus petits. Il s'agit de microvaisseaux, que l'on ne sait pas bien explorer par les techniques actuelles.

Une dysfonction coronaire microvasculaire est impliquée dans toutes les atteintes cardiaques, et notamment dans l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée (ICFEP). Celle-ci est devenue la première présentation d'insuffisance cardiaque dans le monde mais pourtant nous manquons de thérapeutique efficace sur cette forme. Une explication possible est que les causes d'ICFEP sont multiples et pourraient donc nécessiter des traitements adaptés à l'atteinte de chaque patient. L'atteinte de la microvasculature coronaire est fréquente chez les diabétiques qui sont aussi particulièrement touchés par l'ICFEP.

Une nouvelle méthode non invasive, permettant de mesurer l'atteinte de la microcirculation coronaire et utilisant la médecine nucléaire, a été développée. Cette technique brevetée est utilisable en recherche clinique mais aussi en recherche fondamentale. Il a été montré précédemment que cette technique d'imagerie permettait de mettre en évidence une atteinte de la microvasculature coronaire de manière non invasive. Il a également été montré qu'un médicament anti-diabétique, le liraglutide, améliorait les performances cardiaques sans que cette action ne passe par une amélioration de la microcirculation. L'objectif de ce projet est de déterminer si le Sacubitril/Valsartan (Entresto), une nouvelle molécule ayant montré sa supériorité dans la prise en charge de l'insuffisance cardiaque sévère, exerce un effet bénéfique sur la fonction cardiaque par l'intermédiaire d'une action sur la microvasculature coronaire dans un modèle d'insuffisance cardiaque modérée induite par le diabète et reflétant l'ICFEP.

La mesure d'altérations du fonctionnement normal de l'organisme (dit physiologique) au cours d'un processus anormal pathologique (le diabète, ici) rend nécessaire l'utilisation d'un modèle animal. Nous limitons le projet aux seules expériences considérées comme absolument indispensables chez l'animal. Au total 56 rats seront utilisés. Il s'agit du minimum d'animaux nécessaire afin de pouvoir obtenir des résultats exploitables durant le protocole prévu. Tout au long des études *in vivo*, nous respecterons la règle des 3R en tenant compte du fait qu'aucune méthode alternative n'est disponible pour le Remplacement. Les animaux seront hébergés par deux, en cages avec enrichissement du milieu de vie. Les animaux seront suivis bi-quotidiennement afin de contrôler leur bien-être. La mise en place de points limites adaptés permettra de limiter la souffrance de ces animaux. Les injections seront réalisées selon les bonnes pratiques vétérinaires.

14851 La réparation de la hernie est une intervention chirurgicale courante et importante. La plupart des hernies ont été réparées par laparotomie à l'aide d'une prothèse (mesh). Plus d'un million d'opérations de réparation de hernie utilisant des prothèses sont effectuées chaque année aux États-Unis, un nombre similaire en Europe. L'infection s'est avérée la complication la plus courante dans le cas des réparations des hernies avec des taux d'incidence entre 1-4%. L'infection liée à la prothèse herniaire est « une catastrophe chirurgicale », avec des effets dramatiques pour les patients et des coûts importants en soins de santé. La gestion de cette infection repose sur l'administration prophylactique d'antibiotiques, c.-à-d. l'injection de bolus avant l'opération. Mais le véritable avantage en termes de protection contre les infections liées aux mailles reste controversé. Afin de réduire le risque d'infection, un travail important a été effectué sur la fonctionnalisation des prothèses en vue d'un comportement anti-infectieux. Différentes stratégies en utilisant des prothèses en tant que systèmes d'administration de médicaments seront étudiées ici, telles que l'administration d'antibiotiques (gentamicine), des peptides antimicrobiens, de la propolis (miel), etc. Cette étude va examiner l'efficacité anti-infectieux des prothèses herniaires fonctionnalisées pour la

libération prolongée des agents antimicrobiens pour prévenir les infections en milieu opératoire déjà contaminé un modèle animal.

L'objectif est de tester l'activité de la prothèse activée par différentes molécules antimicrobiennes chez la souris C3H/He dans des poches sous-cutanée infectées par des germes bactériens (4 souches) couramment rencontrées dans ce type d'infection. Donc il consiste à créer une poche sous cutanée, implanter un morceau de prothèse antibactérienne dedans, et mettre une dose de bactéries pour simuler l'infection ou le milieu opératoire déjà contaminé, puis le fermer par l'agrafe. Ces prothèses seront prélevées au bout de 7 jours, permettant une étude microbiologique des implants, ainsi qu'une observation macroscopique de la poche.

Nombre total d'animaux pour ce projet sera 216 souris.

Tous les efforts ont été faits pour les remplacer par des alternatives non sensibles, réduire au minimum le nombre d'animaux utilisés et affiner les expériences afin de causer la douleur et la détresse minimales.

Remplace : Bien que les résultats obtenus par les tests *in vitro* (nous aient montré un effet très prometteur) peuvent pas se remplacer à des données *in vivo*, ils nous permettent de sélectionner que le meilleur matériel pour l'étude animaux, donc éviter ou réduire l'utilisation des animaux

Raffiner : 1. Toutes les procédures seront effectuées sur les souris anesthésié ne provoquent aucune douleur. Tout au long de l'opération, les souris seront sous isoflurane, sur plaque chauffante, reçu de l'anesthésie locale (spray de xylocaïne) sur les plaies. Les animaux recevront en postopératoire un traitement analgésique (buprénorphine durant 72 h) et un régime normal ad libitum.

2. Au cours de l'étude, les souris seront observées et surveillé de près chaque jour à l'égard du bien-être animal. Dans le cas nécessaire, la décision de sacrifice sera prise et réalisées avant que les animaux souffrent.

3. Les souris subiront un examen clinique quotidien pour observer l'avancement de la guérison de la plaie, d'éventuels signes de développement de l'infection grave de la plaie, et de rechercher les points limites qui concernent notamment l'altération de l'état général (anorexie, perte de poids rapide ou progressive supérieure à 20%, ou indice corporel de souffrance $<2/5$, etc.) et aussi l'atteinte locale (saignement ou infection sévère autour de l'incision chirurgicale); en cas de problème, des mesures d'urgence sont appliquées, c'est-à-dire, les animaux recevront de la buprénorphine par voie intra-musculaire (10 µg/kg) pour le contrôle de la douleur pendant 48 h. Si la prise en charge n'est pas efficace, une euthanasie sera réalisée par injection de 1 mL de T61® en intra cardiaque.

Réduire : En référence aux publications antérieures, minimum 9 animaux par groupe sera suffisant pour montrer avec une puissance statistique suffisante ($\alpha=80\%$, $p=0.05$). Les études précédentes ont été réalisées pour démontrer les procédures expérimentales, avec laquelle les objectifs scientifiques sont atteints.

14852 Ce projet vise à comprendre quels sont les déterminants qui influent sur le succès transfusionnel des concentrés plaquettaires.

Les composants plaquettaires (CPs) sont des produits thérapeutiques pour lesquels il n'existe pas de substitut. Ils représentent environ 10% des Produits Sanguins Labiles transfusés mais induisent jusqu' 40% des effets indésirables.

Cela est dû en partie aux produits sécrétés par les plaquettes elles-mêmes. Notamment, diverses molécules sécrétées par ces dernières influent sur la réponse biologique et ont des conséquences inflammatoires graves. Les raisons pour lesquelles les plaquettes s'activent et libèrent ces molécules ne sont pas encore entièrement comprises. Elles pourraient être dues à plusieurs paramètres, y compris les incompatibilités entre les donneurs et les receveurs, mais également le processus de préparation et de préservation des plaquettes.

Ce protocole vise à explorer quelles sont les caractéristiques entravant le rendement transfusionnel des CPs. Notre objectif final est d'améliorer les processus de préparation des composants

plaquettaires et le diagnostic des produits dégradés afin de réduire les complications transfusionnelles. Les paramètres permettant cela seront évalués dans des modèles de souris immunodéficients pouvant accepter la transfusion de plaquettes humaines.

Ce projet portera sur un total de 3318 souris sur 5 ans. Le nombre de souris est justifié par les conditions de préparation des CPs envisagés.

Plusieurs groupes de souris sont ainsi définis, permettant l'investigation de 60 modalités de stockages/préparation des concentrés par rapport à une modalité contrôle (61 conditions).

Cet effectif de 3318 souris correspond à

Lot 0 pilote 24 souris utilisées dans le cadre de la mise au point, l'approbation du modèle expérimental et la maîtrise des gestes opérationnels.

Lot Contrôle : 18 souris permettant la mesure du rendement transfusionnel et divers prélèvement prévus et détaillés plus bas.

Lots 1-60 18 souris/modalité de stockage/préparation.

Chaque modalité (Lots 1-60 et contrôle) est répétée 3 fois.

Cet effectif a été réduit au maximum sans mettre en péril l'interprétation statistique et la valorisation des résultats. La réduction de cet effectif provient notamment des études *in vitro* préalables et permettant l'identification des modalités de transformation des CPs d'intérêt. Ainsi, nous retenons seulement les modalités présentant un intérêt scientifique. Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité, par du personnel qualifié, pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. La douleur est rigoureusement contrôlée grâce à des points limites évalués en amont, et gérée grâce aux moyens pharmacologiques appropriés si besoin (myorelaxant/anesthésie/analgésie). Par ailleurs, les animaux sont hébergés en groupes harmonieux (minimum de 2); dans un environnement enrichi (copeaux, matériel de nidification, bâtonnets à ronger). Enfin, l'eau et la nourriture sont mises à disposition "ad libitum".

14853 Compte tenu du vieillissement de la population, l'amélioration de la qualité de vie et la conservation de l'autonomie de la personne âgée représentent de véritables enjeux médico-économiques. Dans ce contexte, il est important de s'intéresser aux pathologies liées au vieillissement telles que la sarcopénie. La sarcopénie est un syndrome lié au vieillissement, correspondant à une perte progressive et généralisée de masse, de force et de fonction musculaire, elle touche 40% des personnes âgées de plus 70 ans. La sarcopénie entraîne l'augmentation de la dépendance des personnes âgées et génère un état de fragilité vis-à-vis des agressions environnementales, ce qui augmente la morbidité et la mortalité. Le risque de sarcopénie est augmenté chez les personnes sédentaires et dénutries.

Ce projet a pour objectif de limiter, par une stratégie nutritionnelle, la survenue de la sarcopénie en utilisant les propriétés de certaines bactéries du genre des Lactobacilles à améliorer l'utilisation de l'énergie d'origine alimentaire. En effet, il a été observé, chez des patients ayant subi une résection chirurgicale de l'intestin grêle, que l'efficacité d'utilisation de l'énergie d'origine alimentaire était améliorée. En parallèle il a été montré que ces patients possédaient un microbiote intestinal enrichi en certaines souches de Lactobacilles. Il est également connu qu'une amélioration de la santé intestinale favorise la redistribution des nutriments énergétiques et azotés de l'aire splanchnique (foie/intestin) vers les tissus périphériques dont le muscle. Dans une étude, un transfert de flore intestinale issu de patient à l'intestin réséqué vers des rats a amélioré l'efficacité de la récupération de l'énergie d'origine alimentaire.

Par conséquent, nous nous proposons de tester *in vivo* l'impact d'un nouveau probiotique fonctionnel sélectionné préalablement (parmi des souches de lactobacilles) sur leur capacité à favoriser la croissance et l'efficacité de récupération de l'énergie *in vitro*. L'impact du probiotique sera testé sur les ingérés, les dépenses énergétiques et le métabolisme énergétique de rats adultes et âgés ainsi que l'adaptation des tissus et des organes à l'aliment probiotique (intestin, foie, muscle, tissu adipeux) (y compris le microbiote en divers sites intestinaux).

Le protocole proposé s'inscrit dans le respect de la règle des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement) pour l'expérimentation animale. Nous ne pouvons pas remplacer cette expérimentation animale par une expérimentation *in vitro* ou *ex vivo* mais nous avons réduit le nombre d'animaux en optimisant le nombre d'animaux par lots. Nous mettrons en oeuvre des méthodes permettant de limiter au maximum la douleur et la souffrance de nos animaux, en utilisant des cages adaptées, une anesthésie avant sacrifice et en surveillant quotidiennement les animaux afin de prendre rapidement des décisions de soins ou d'exclusion d'animaux en souffrance.

Le projet prévoit la mise en place d'une intervention nutritionnelle chez le rat adulte (n=75) et âgé (n=155). Une étude pilote sur rats adultes (n=20) sera mise en place car aucune donnée bibliographique n'est encore disponible sur l'effet potentiel des bactéries qui seront sélectionnées sur l'appétit des animaux.

In fine, l'étude proposée permettra de fournir des résultats scientifiques sur l'intérêt potentiel de certains probiotiques dans le maintien et la récupération musculaire des personnes âgées ou malades.

14854 Ce projet consiste à réaliser la formation pratique des personnels Concepteur ou Applicateur de projets expérimentaux utilisant des animaux à des fins scientifiques (chercheurs, enseignants-chercheurs et doctorants). En effet, selon le décret 2013-118 du 1er février 2013, toute personne manipulant des animaux vivants dans le cadre d'une activité de recherche ou pédagogique doit avoir suivi et validé une formation initiale spécifique Applicateur ou Concepteur, agréée par le ministère de l'agriculture et de l'alimentation et adossée réglementairement à l'agrément des locaux d'animalerie de l'établissement porteur du projet de formation. Cette formation qui répond au cadre réglementaire sera réalisée dans le module complémentaire de la formation initiale avec une spécialisation « rongeurs » (rats/souris). Des sessions de travaux pratiques seront réalisées afin de former les personnels aux techniques de base de manipulation des rongeurs.

Conformité/exigences de la règle des 3R :

Remplacer : La formation aux bons gestes techniques permettant ensuite de raffiner et de réduire le nombre d'animaux utilisés dans les projets scientifiques ne peut pas être réalisée autrement que sur l'animal.

Réduire Le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum tout en permettant la réalisation des actes expérimentaux pour chaque personne en formation en réduisant le nombre de manipulation sur chaque animal.

Raffiner Pendant toute la période précédant la mise en oeuvre du projet, les animaux auront reçu un enrichissement adapté. Les animaux utilisés seront issus d'élevages et destinés à l'euthanasie (animaux surnuméraires sexe et génotype en inadéquation avec les projets en cours, animaux reproducteurs trop âgés).

Toutes les procédures utilisées dans ce projet rentrent dans la classification des procédures de classe légère. Afin que chaque personnel en formation appréhende les gestes techniques qui seront réalisés dans la partie pratique de leur formation, des enseignements en travaux dirigés utilisant des vidéos de démonstration et des mannequins en silicone « réalistes » précéderont les travaux pratiques.

Les animaux utilisés dans ce projet sont des animaux surnuméraires issus des élevages. 400 animaux seront utilisés au maximum dans ce projet sur une durée de 5 ans (200 souris et 200 rats).

14855 La santé animale se développe en adéquation avec les exigences de la qualité des soins vétérinaires et des attentes des foyers ayant un animal de compagnie, en s'appuyant sur les avancées de cette médecine, souvent en synergie avec les savoirs et développements technologiques en santé humaine.

Les vétérinaires, à l'issue d'une formation théorique et pratique de 5 ans (7 ans post bac), ont appris les soins à apporter aux grands groupes d'espèces domestiques carnivores, équins, ruminants, porcs, volailles et NAC (reptiles, rongeurs, oiseaux, poissons).

A l'issue de cette formation initiale, les vétérinaires auront appréhendé l'ensemble des grands domaines cliniques (médecine interne, chirurgie, reproduction, nutrition, dermatologie, oncologie, ophtalmologie, imagerie...), sans pour autant se sentir autonomes dans toutes ces disciplines au moment de leur arrivée sur le marché du travail.

Si des spécialisations sont possibles, en poursuivant encore les études sur 3 ans dans un domaine précis, nombre de vétérinaires se retrouvent vite confrontés à la pratique en autonomie dans leur cabinet. Traditionnellement, c'est l'expérience après des années d'exercice (sur les animaux de leur clientèle) qui leur permet de se former et de progresser dans leur pratique.

La formation initiale des vétérinaires comporte peu de modules de chirurgie. Ceux-ci se retrouvent rapidement seuls pour opérer, en particulier pour les interventions de convenance (castrations, ovariectomies) et les chirurgies courantes (plaies par morsures, abcès, corps étrangers, extractions dentaires, calculs vésicaux...).

Afin d'accélérer leur autonomie, leur taux de réussite et leur expertise en chirurgie, les vétérinaires praticiens peuvent suivre des formations spécifiques qui allient théorie et pratique, en intégrant les nouvelles techniques innovantes mini invasives.

La chirurgie mini-invasive se développe en effet dans tous les domaines de la chirurgie, aussi bien humaine qu'animale, avec pour intérêt de limiter le traumatisme opératoire, les douleurs, les saignements et les cicatrices, et donc permettre une récupération plus rapide des patients.

Un paramètre indispensable au succès de ces approches mini-invasives est la formation des praticiens aux techniques chirurgicales particulières et à la maîtrise des technologies utilisées.

Le but de ce projet est de proposer des sessions de formation en chirurgie pour les vétérinaires, jeunes diplômés ou confirmés, qui souhaitent acquérir ces techniques chirurgicales mini-invasives. A l'issue de la formation, les professionnels doivent être en mesure de reproduire eux-mêmes la procédure, seuls dans leur cabinet, en toute sécurité pour les animaux qu'ils soignent.

Nos formations s'articulent autour de cours théoriques et de discussions avec des spécialistes s'appuyant sur des démonstrations vidéo. Une partie pratique est ensuite proposée à chaque participant pour valider ces gestes en conditions opératoires réelles sous la supervision d'un(e) expert(e).

L'apprentissage est proposé sur le modèle porcin car il procure de nombreuses homologues pour la pratique de la chirurgie sur mammifères (anatomie des organes viscéraux et thoraciques, physiologie, taille compatible avec les instruments chirurgicaux disponibles sur le marché...).

Les animaux modèles sont opérés sous anesthésie générale et monitoring, avec un niveau de qualité technique et matérielle identique à celui des blocs opératoires en milieu hospitalier humain.

Sur 5 ans, le nombre maximal de porcs a priori nécessaire est de 408, ils permettront de former plus de 800 vétérinaires.

La contribution d'animaux à des fins expérimentales et pédagogiques a été mise en place en conformité avec la démarche éthique des 3R

-Remplacer : 60% du temps de chaque formation est dédié à des modèles alternatifs le Remplacement est appliqué par utilisation de supports non-vivants (mannequins, simulateurs...) et de prélèvements d'abattoir afin de minimiser le recours aux animaux vivants lorsque cela est possible.

Pour certaines parties pratiques, il n'existe toutefois pas de méthode de substitution qui permette de restituer fidèlement les comportements et réactions physiologiques des animaux opérés (respiration, paramètres cardiovasculaires, réanimation...) et/ou la manipulation des tissus vivants (perfusion, ischémie, hémorragie, complexité des voies d'abord...).

-Réduire : Le nombre d'animaux utilisés dans ces formations a été réduit à son minimum sans compromettre les objectifs de formation.

Un même animal est utilisé pour réaliser plusieurs procédures et former plusieurs vétérinaires. Cela permet à chacun de pouvoir s'exercer à l'ensemble des techniques chirurgicales enseignées, tout en utilisant le moins d'animaux possible.

-Raffiner : Toutes les méthodes appropriées sont utilisées pour gérer la douleur et le stress éventuels.

Les porcs sont hébergés dans des locaux aux normes européennes, ils sont maintenus en groupes sociaux dans un environnement enrichi qui leur permet d'exprimer leurs comportements naturels (jeux à mâchouiller, fourragement, aire de repos). Des techniciens animaliers habilités prennent soin d'eux au quotidien, toute anomalie est reportée au vétérinaire et à la structure en charge du bien-être animal (SBEA).

Toutes les interventions chirurgicales sont réalisées sous anesthésie générale profonde, selon un protocole sans réveil à l'issue duquel l'animal est euthanasié.

14856 Des maladies telles que l'acné ou le mélasma peuvent être à l'origine de nombreuses lésions cutanées. De nouveaux traitements par photothérapie dynamique sont mis en place et à l'heure actuelle un premier laser tirant avec une puissance de 10 Watt permettant d'apporter une puissance plus élevée est en test. Après des premiers résultats concluants nous souhaitons tester une nouvelle version permettant d'apporter une puissance effective de 20 Watt. Pour pouvoir continuer nos enregistrements et avant mise sur le marché, des évidences pré-cliniques sur modèle animal doivent être validées afin de démontrer l'équivalence de notre nouveau dispositif médical.

L'objectif de ce projet est donc de montrer pour les deux lasers :

- La profondeur de pénétration
- la zone de dégât thermique
- la cicatrisation post traitement

L'étude doit être réalisée :

- pour différentes puissances (mJ) : 8, 14, et 20 pour le premier laser, 30 et 40 pour le deuxième
- pour chaque puissance il faut tester plusieurs densités de spot (nombre de faisceaux par cm²) soit 49, 100, 196 et 324
- pour chaque stacking, c'est à dire la répétition du quadrillage laser sur la même zone.

Nous suivrons la cicatrisation en effectuant des biopsies à T0 (juste après traitement), J1, J3-5 et J10-15 La cicatrisation sera ensuite étudiée grâce à des coupes histologiques de nos échantillons.

Nous prévoyons d'utiliser pour cette étude au maximum 6 porcs (2 pour le premier laser, 2 pour le deuxième et 2 surnuméraire si nécessité de refaire une procédure) et les différentes manipulations seront effectuées selon les principes des 3 R : 1) Réduction : le nombre d'animaux a été réduit à la plus petite quantité possible après l'application des formules statistiques pour obtenir des résultats significatifs. De plus le traitement par laser étant indolore et les biopsies cutanées des très petites tailles (stylo à biopsie de 5mm de diamètre) nous effectuerons le maximum de tirs laser sur chaque animal. 2) Remplacement : De trop nombreux facteurs complexes intervenant dans la cicatrisation ne peuvent être reproduits en in-vitro ou par simulateur, c'est pourquoi la seule possibilité pour cette étude est le modèle in-vivo. 3) Raffinement : l'ensemble des procédures sera fait par du personnel formé, les animaux traités avec soin (traitement de la douleur lors du suivi, anesthésie) et dans un hébergement répondant à leurs besoins physiologiques (Température, cycle de lumière 12h-12h,) et éthologiques (enrichissements, dimension des boxes,).

14857 La complexité de l'environnement tissulaire et le réseau de cellules immunitaires impliquées dans la régulation de ces réponses immunitaires ne pouvant pas être reproduits entièrement *in vitro*, la réalisation d'expériences à l'échelle de l'animal est nécessaire. Afin de tester le rôle de la régulation de l'expression génétique dans l'orchestration des réponses immunitaires, nous souhaitons développer des modèles ciblant les séquences régulatrices de l'expression de gène, appelées « enhancers ».

Les « nanoblades » sont un nouvel outil de livraison des ciseaux moléculaires CRISPR/Cas9. L'objectif de ce projet est de déterminer si les « nanoblades » peuvent être utilisés pour développer de nouveaux modèles animaux ayant des cellules immunitaires présentant des modifications ciblées « enhancer ». Pour cela, les cellules de moelle osseuse de souris donneuse seront traitées

in vitro par les « nanoblades » spécifiques de ces « enhanceurs », puis transférées dans des souris receveuses. L'efficacité de cette approche sera évaluée 2 mois après transfert.

La réalisation de ce projet permettra de faire la preuve de concept de notre capacité à générer des animaux chimères ayant un système immunitaire modifié. Cela sera utile directement pour nos projets de recherche mais pourra également être utile à l'ensemble de la communauté scientifique.

La souris a été sélectionnée, car c'est un mammifère de choix pour le ciblage génétique et l'étude des maladies humaines, ce qui nous permettra de tester le rôle de nos cibles d'intérêt dans le cadre d'une réponse immunitaire physiologique. Par souci de raffinement, dans un premier temps, des études préliminaires *in vitro* ont été effectuées à partir de cellules primaires dérivées de moelle osseuse de souris pour déterminer l'efficacité des « nanoblades » à cibler les régions d'intérêt du génome. Les souris sont ici utilisées pour des expériences où le remplacement par des systèmes de culture cellulaire *in vitro* ne permettent pas d'adresser notre question de recherche. Nous utiliserons des souris donneuses portant des gènes rapporteurs fluorescent. Ainsi nous pourrions suivre l'efficacité du ciblage par les « nanoblades » par cytométrie en flux, technique qui nécessite peu de cellules, ce qui nous permettra de réduire le nombre total d'animaux utilisés. Par ailleurs, chaque fois qu'il est possible de mener des expériences en parallèle, une collecte de tissus et de cellules pour différentes expériences sera effectuée à partir des mêmes animaux afin de réduire le nombre de souris nécessaires pour des expériences définitives. Le raffinement au moyen de méthodes qui soulagent la douleur réduira la détresse des animaux. Par ailleurs, le bien-être des animaux sera surveillé régulièrement et l'évaluation de la souffrance éventuelle permettra de déterminer les points limites. Enfin, un minimum d'animaux seront utilisés pour obtenir des résultats statistiquement significatifs.

Nous prévoyons d'utiliser 96 souris au total.

14858 Nous nous intéressons tout particulièrement au dialogue entre l'hippocampe et le cortex, deux structures cérébrales qui jouent un rôle clé dans la formation et la stabilisation des souvenirs. Nous souhaitons mettre en évidence les modifications du réseau vasculaire qui accompagnent ce dialogue au moyen de l'échographie ultrarapide. Cette technique permettra de mesurer l'évolution du flux cérébral sanguin et les modifications fonctionnelles du réseau vasculaire intracérébral chez des rats libres de leurs mouvements et engagés dans une procédure comportementale. Dans les études sur la mémoire, il n'est pas possible de remplacer le modèle animal par des méthodes de substitution. Le bien-être des animaux, engagés dans un test comportemental est crucial; leur suivi est quotidien, de leur arrivée au laboratoire jusqu'à la fin de l'expérience. Des rats seront soumis à un test cognitif permettant d'appréhender les différents processus de la mémorisation (encodage, consolidation et rappel des souvenirs). Les paramètres échographiques seront enregistrés avant le test, pendant le test et lors du test de rappel de la mémoire formée 1 jour (mémoire récente) ou 30 jours (mémoire ancienne) après apprentissage. L'échographie ultrarapide permet un suivi longitudinal des animaux, ce qui participera à une réduction considérable du nombre d'individus impliqués dans ce type d'étude. Basé sur l'observation éthologique du comportement social du rat et non-aversif, le test de transmission sociale de préférence alimentaire est peu source de stress pour l'animal. Le raffinement des protocoles nous permet de proposer une seule opération chirurgicale qui permettra d'installer sur l'animal le support de la sonde échographique pour ensuite investiguer son réseau vasculaire cérébral alors qu'il restera parfaitement libre d'agir dans sa cage d'hébergement, qui sera aussi son environnement de test. La douleur post-chirurgicale sera prise en compte par un traitement analgésique et un suivi quotidien pendant les jours suivant la chirurgie. Cette série d'expériences est une étape cruciale pouvant déboucher sur l'établissement d'un protocole du suivi de l'activité cérébrale sur des modèles rongeurs se comportant, sans autre contrainte que la connexion non invasive d'une sonde échographique. Nous devons mesurer les paramètres échographiques dans des groupes échographiés dans différentes zones du cerveau impliqué dans la rétention du souvenir sur le long terme. Des groupes de 12 animaux seront nécessaires pour chaque protocole. Les animaux subiront une échographie avant d'être inclus dans le test d'apprentissage, puis seront échographiés à différentes étapes clés de la consolidation du souvenir après l'apprentissage et lors du test durant lequel ils devront utiliser leur souvenir. Nous

comparerons une souche de rats contrôle pour la comparer à une souche de rats hypertendus. La réalisation de l'ensemble du projet demandera 216 rats. La réalisation d'expériences indépendantes mixant des individus de plusieurs groupes permettra de mieux suivre les animaux au cours du temps, et peut-être de réduire encore le nombre d'animaux

14859 Contexte scientifique

Les maladies cardiovasculaires représentent la première cause de décès dans le monde. Malgré les progrès récents et la mise en place de stratégies thérapeutiques visant à diminuer le mauvais cholestérol dans le sang, plus de 17 millions de patients décèdent de pathologies cardiovasculaires chaque année. Récemment, l'inflammation est apparue comme étant une composante centrale contribuant au développement des maladies cardiovasculaires mais les mécanismes qui régissent cette inflammation restent inconnus. Ce projet vise à identifier et valider de nouvelles voies métaboliques qui contribuent à l'inflammation liée aux maladies cardiovasculaires telles que la voie de la lipolyse, source de production des acides gras.

Problématique

Un dérèglement du recrutement et de la fonction des globules blancs, en charge des défenses immunitaires, est souvent associé à la progression des maladies cardiovasculaires telles que l'obésité ou l'athérosclérose. L'athérosclérose est une pathologie causée par l'obstruction des vaisseaux sanguins due à l'accumulation de lipides et de cholestérol dans la paroi de ces vaisseaux. Les lipides et cholestérol ainsi accumulés vont être à l'origine du développement d'une plaque dite « d'athérome » ayant pour effet d'attirer de nombreux globules blancs et induit une inflammation qui contribue à l'augmentation de la taille de la plaque. Ainsi, le recrutement de globules blancs des vaisseaux sanguins vers la plaque d'athérome est considéré comme un des mécanismes majeurs contribuant à la progression de l'athérosclérose. Cependant, les mécanismes responsables de la mobilisation des globules blancs à partir de la moelle osseuse (lieu de leur génération) vers la plaque restent à ce jour mal comprises. Une meilleure compréhension permettra de contrôler leur nombre dans le sang et leur mobilisation au niveau de la plaque d'athérome et pourrait prévenir la progression de l'athérosclérose. De plus, la génération et le recrutement des globules blancs présente, de façon physiologique, un rythme circadien (du grec *circa dies* presque un jour) qui varie au cours de la journée et de la nuit. Il est donc important de prendre en compte cette composante circadienne dans notre étude afin de refléter au mieux la physiologie des globules blancs.

Hypothèse de travail

Notre projet de recherche vise à étudier la dynamique des globules blancs et de leur différenciation en macrophages au cours de l'athérosclérose. Pour cela nous utilisons des modèles murins déficients pour la production d'acides gras à partir du tissu adipeux afin de déterminer l'impact des acides gras sur les globules blancs ainsi que les mécanismes qui régulent l'activité de ces cellules. Nous analysons cela dans des modèles précliniques de pathologies cardiovasculaires bien définis et validés par la communauté scientifique.

- Remplacement Nous avons montré *in vitro* que la production des acides gras par les adipocytes (lipolyse) induit des changements dans le fonctionnement des globules blancs dans un système de co-culture. Un système *in vivo* intégrant les interactions cellulaires et tissulaires complexes est donc indispensable à cette étape de notre étude. Les souris déficientes pour la lipolyse du tissu adipeux ne présentent pas de phénotype dommageable. Ces souris ont un développement normal et ne présentent pas de problème de survie ou de reproduction.

Les souris étant naturellement protégées contre le développement des maladies cardiovasculaire comme l'athérosclérose, des modèles murins de l'athérosclérose ont été développés et validés par la communauté scientifique comme outils d'études précliniques. Sous régime riche en graisse, les souris déficientes pour ApoE présentent une augmentation du cholestérol plasmatique et une augmentation du nombre de globules blancs circulants. A partir de l'âge de 3 mois, se développent des plaques au niveau des artères, représentatives des complications humaines et essentielles à l'étude de l'athérosclérose.

- Réduction Pour réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés nous utiliserons toutes les souris, mâles et femelles, dans nos expérimentations. Nous avons également réalisé une étude statistique précise et adaptée pour nous permettre de poursuivre notre projet en vue d'une future publication. Ainsi nous avons calculé que 200 souris devraient être utilisées et réparties sur une période de 2 ans.

- Raffinement Pour garantir le bien-être animal, nous utilisons une technologie de système inductible (système Cre-Lox) qui permet d'induire les mutations de façon contrôlée à un instant choisi de la vie de la souris. La durée et l'installation de la pathologie sont ainsi précises et définies. Après le sevrage des souris, nous respecterons également un temps d'adaptation avant toute manipulation pour éviter tout stress supplémentaire. Dans le but d'étudier les rythmes circadiens des globules blancs, nous avons également investi dans une armoire en cycle inversé et mis en place une période commune de lumière afin de toujours manipuler les animaux à la même heure et limiter l'impact de l'expérimentateur.

Pour répondre à leurs besoins naturels, les animaux sont hébergés en groupe avec des igloos dans les cages, de la ouate et éventuellement une baquette en bois à ronger.

Perspectives

Cette étude pourrait ouvrir de toutes nouvelles perspectives de traitement visant à mieux contrôler la mobilisation et le recrutement des globules blancs et ralentir le développement des maladies cardiovasculaires comme l'athérosclérose. L'ensemble des procédures proposées dans ce projet sont connues comme non remplaçables, par des procédures ne faisant pas intervenir directement l'animal.

14860 Les lésions cervicales représentent une des causes majeures d'invalidité physique chez l'adulte. Elles constituent 36% des lésions spinales. Les causes sont multiples et comprennent notamment les accidents de la route, certaines activités sportives (plongeurs), chutes (personnes âgées) ou encore la présence de tumeurs. Il s'agit d'une pathologie croissante du fait de l'augmentation de sa fréquence corrélée à notre mode de vie actuelle. Parmi les nombreux candidats cellulaires possibles pour réparer ces lésions, les cellules souches olfactives (CSO) sont de premier intérêt. Ces dernières ont été largement décrites depuis le début du siècle et de nombreuses études ont mis en évidence leur rôle bénéfique dans différents modèles pathologiques. De ce fait, nous nous proposons d'évaluer le potentiel thérapeutique des CSO par autogreffes dans un modèle rat spino-lésé induit par compression cervicale évitant ainsi l'utilisation d'antirejet. Les conséquences neurologiques de la compression ont des répercussions souvent irréversibles, délétères et engendrent des conditions de vie et de bien-être très détériorées pour lesquelles les traitements sont actuellement essentiellement palliatifs. La perte de cellules nerveuses, l'axotomie, la démyélinisation provoquent la dégradation de nombreuses fonctions. Les déficiences des fonctions motrice et respiratoire causées par des lésions spinales hautes peuvent entraîner une tétraplégie nécessitant une assistance ventilatoire transitoire ou permanente. De plus, la perte des sensations et des fonctions autonomes après une lésion spinale diminue la qualité de vie de la personne blessée et conduit à son isolement social. Les cellules souches pourraient remplacer les cellules nécrosées, et/ou favoriser la régénération du tissu en potentialisant les capacités plastiques des cellules épargnées via des facultés neurotrophiques ou immunomodulatrices. L'approche thérapeutique par l'autogreffe de ces cellules permet, outre l'éviction de considérations éthiques, de se dédouaner des problèmes immunologiques. Après avoir évalué les déficiences neurologiques créées par la compression spinale, au niveau locomoteur grâce aux tests de l'Echelle, Catwalk, BBB score, à la suite de nos autogreffes les performances sur ces tests seront à nouveau enregistrées ainsi que les capacités respiratoires par le biais à la fois d'études électrophysiologiques diaphragmatique et neurographique (nerfs phréniques) puis par la stimulation des voies bulbo-spinales descendantes. Enfin, des analyses immunohistochimiques seront effectuées dans le but d'étudier le devenir de ces CSO au niveau des atteintes spinales. Pour notre étude globale d'une durée totale de 3 ans, nous envisageons d'utiliser un nombre de 60 rats Sprague Dawley mâles (OFA) répartis en 3 groupes. En effet, toute étude impliquant du comportement et la reproduction d'un modèle pathologique nécessite d'avoir recours à des animaux. L'étude du

potentiel thérapeutique de greffes autologues de CSO dans un modèle spino-lésé ne peut être faite que par un suivi *in vivo* des CSO GFP+ transplantées. La douleur, la souffrance et l'angoisse seront diminuées à leur maximum en utilisant une anesthésie générale (isoflurane ou le mélange Kétamine/Xylazine), locale (infiltration de Xylovet) et des analgésiques appropriés pendant et après les différentes chirurgies. Les animaux seront observés quotidiennement par un personnel expérimenté et leur état sera évalué selon une grille d'évaluation appropriée. Les animaux auront un accès ad libitum à la nourriture et à l'eau. En stabulation les animaux seront placés dans des conditions d'hébergement standard dans des cages enrichies par des briquettes en bois et/ou une couche épaisse de copeaux de bois. Un délai minimum d'une semaine sera respecté entre la réception des rats et la date de la chirurgie. Tout sera mis en œuvre pour réduire au minimum le nombre d'animaux et permettre d'appliquer aux résultats obtenus des comparaisons de moyenne (analyses de variance).

14861 Le microbiote intestinal représente l'ensemble des bactéries et microorganismes de notre tube digestif et modère le système immunitaire de l'hôte. La cohabitation avec le microbiote nécessite un équilibre permanent, faisant intervenir notamment la perméabilité intestinale. Certains processus pathologiques dont le cancer s'accompagnent d'une augmentation de la perméabilité intestinale dont les conséquences pour la santé humaine sont importantes (inflammation, amaigrissement et augmentation de la mortalité). Le maintien de la perméabilité intestinale nécessite plusieurs mécanismes moléculaires au niveau des cellules épithéliales intestinales. Le but de ce projet est d'étudier l'impact du cancer et du microbiote sur la perméabilité intestinale, et de comprendre les mécanismes impliqués dans ces processus. Pour cela, un modèle de souris dont les cellules intestinales auront été modifiées génétiquement sera développé. La perméabilité intestinale sera évaluée par la mesure du passage systémique de marqueurs normalement non absorbés après administration orale dans des modèles de cancers, après modification du microbiote et en réponse à des traitements pharmacologiques identifiés au cours de nos recherches. Les résultats de ce projet permettront de mieux comprendre les interactions entre microbiote, perméabilité intestinale et cancer, dans le but d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et de corriger le phénomène d'hyperperméabilité intestinale responsable d'une morbidité importante dans le cadre du cancer avancé.

L'étude de la perméabilité intestinale ne peut être réalisée qu'*in vivo* en raison des multiples facteurs mis en jeu (jonctions entre les cellules épithéliales, architecture intestinale et production de mucus, interactions avec le microbiote) qui ne peuvent être recréés que dans un modèle animal. Nous effectuerons en parallèle plusieurs expériences de culture cellulaire qui permettront de cibler les molécules à tester chez la souris. La validation finale des cibles ainsi identifiées ne pourra être effectuée qu'*in vivo*, pour les raisons indiquées ci-dessus. L'étude sera stoppée si les expériences initiales sont négatives par rapport à l'hypothèse de travail.

Nous chercherons à regrouper les expérimentations afin de garder un nombre minimum d'animaux dans les groupes contrôles. Dans la réalisation de ce projet, qui dure 5 ans et qui compte au maximum 848 souris, l'ensemble des procédures a été mis au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal.

Les principales contraintes pour les animaux dans ce projet seront l'implantation de tumeurs du poumon. Pour le suivi des tumeurs, il sera fait au moyen de bioluminescence, procédé non invasif et qui permet des détections plus précoces, donc plus raffiné.

Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et adaptées en accord avec le personnel de l'animalerie (les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum; le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification, des tunnels en cartons, et bâtonnets à ronger). Les animaux sont observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être. La mise en place d'un suivi strict des points limites permettra d'éviter au maximum le stress et/ou la douleur au cours de l'expérimentation. De plus, le personnel impliqué dans ce projet est qualifié sur le plan technique et formé en continu sur les pratiques d'expérimentation animale. Il assure également une veille scientifique continue, évitant toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature.

14862 Le nombre de personnes atteintes de maladies associées à un déséquilibre alimentaire comme le diabète, l'hypertension et l'athérosclérose s'est accrue de manière épidémique dans les pays développés. Compte tenu du lien étroit entre ces pathologies et l'obésité, cela pose un grave problème de santé publique. En plus de la multitude de facteurs environnementaux et comportementaux (alimentation, mode de vie) connus pour être impliqués dans le développement et la progression de ces pathologies, on sait maintenant que le comportement alimentaire et métabolisme énergétique nous sont, en partie, dictés par notre héritage non-génétique transmis par nos parents. Ainsi l'alimentation d'un individu influencerait non seulement l'expression de ses propres gènes mais également celle des gènes de sa descendance. Ce processus est appelé hérédité épigénétique. Ces dernières années, nous avons fait des avancées importantes dans la compréhension des mécanismes moléculaires impliquées dans ce mode d'hérédité en montrant d'une part qu'un stress environnemental pouvait modifier les informations non-génétiques et transmissibles des cellules reproductrices et que d'autre part ces modifications pouvaient être transmises à la descendance.

Alors que les études concernant l'hérédité de l'obésité et du diabète type 2 sont bien avancées, très peu de choses sont connues quant à l'hérédité épigénétique des maladies cardiovasculaires. L'objectif de la présente application est de développer un modèle expérimental murin qui développe des maladies cardiovasculaires dans un contexte génétiquement non modifié. Un tel modèle expérimental n'existe pas à l'heure actuelle et fait cruellement défaut pour étudier le processus d'hérédité épigénétique de ces maladies.

Pour cela, nous allons nourrir pendant plusieurs générations successives des mâles avec un régime déséquilibré (nourriture enrichie en cholestérol). Cette nourriture induit la formation de dépôts graisseux sur la paroi des artères (plaques d'athérome) chez la souris mais uniquement dans des contextes génétiques mutants. Nous souhaitons savoir si le maintien de cette nourriture pendant plusieurs générations chez la souris sauvage induit le développement de ces plaques. Cette nourriture sera donnée à des souris mâles âgés de 3 semaines pendant une période de 3 mois. Ensuite nous étudierons les caractères cardiovasculaires de ces souris et de leurs descendants. L'avantage premier de ce modèle est de pouvoir étudier l'effet transgénérationnel de cette nourriture dans un laps de temps relativement court. Néanmoins ce temps relativement court est "long" pour un projet de recherche puisque nous pensons maintenir cette nourriture pendant 5 générations. Une génération de souris étant d'environ 4 mois, il nous faudra donc 20 mois pour obtenir le modèle et pouvoir l'étudier. Le nombre de souris total et maximum utilisé pour ce projet est de 576 souris mâles.

Notre travail porte sur la possible transmission par le père de caractères nouvellement acquis sur un mammifère. L'hérédité transgénérationnelle est un mécanisme complexe d'interaction pour lequel il n'existe pas, à l'heure actuelle, de modèles *in vitro*. Etant donné que les mécanismes moléculaires de ce type d'hérédité ne peuvent être analysés *in vitro*, nous sommes forcés d'utiliser un modèle murin, modèle de mammifères permettant de visualiser la formation de plaques d'athérome, par exemple. En plus, il n'est pas possible d'analyser certaines modifications épigénétiques majeures chez le ver (*C. elegans*) comme la méthylation de l'ADN ou visualiser la formation de plaque d'athérome. L'emploi d'un modèle animal comme la souris récapitulant la physiopathologie des maladies cardiovasculaires (notamment les cardiopathies coronariennes) chez le mammifère est donc essentiel (Remplacement).

Afin de calculer la taille de l'échantillon absolument nécessaire statistiquement, nous avons réalisé un calcul de puissance, test qui permet de minimiser le nombre d'animaux nécessaires pour valider ou non notre hypothèse de départ (Réduction).

Dans un souci de Raffinement, nous mettons en place toutes les dispositions permettant de minimiser les souffrances éventuelles qui pourraient être associées à nos expériences, notamment le recours à l'anesthésie. Ensuite des analyses moléculaires et histologiques seront réalisées sur différents tissus prélever sur chacune des souris.

14863 Objectif du projet :

L'acné est une maladie chronique qui touche plus particulièrement les adolescents mais se rencontre également chez l'adulte. La physiopathologie de l'acné est caractérisée par un épaissement du canal pileux (hyper-kératinisation), pouvant aboutir à son obstruction, et une hypersécrétion de sébum (hyperséborrhée). Ces lésions peuvent devenir inflammatoires.

Malgré des recherches approfondies sur l'étiologie de l'acné, la séquence exacte des événements et des mécanismes possibles reste inconnue.

Cependant, ces mêmes recherches ont montré un lien entre hyperséborrhée et niveau d'androgène. En effet, cliniquement, la régulation du niveau d'androgènes endogènes diminue les lésions acnéiques et limite les symptômes de pathologies à composantes hyper séborrhéiques.

Aucun animal ne développant spontanément de l'acné, des modèles ont été développés pour reproduire au moins une des caractéristiques de la physiopathologie de l'acné.

Ce projet a pour but d'évaluer l'activité anti-androgénique de molécules après administrations répétées par voie topique (directement sur la peau) chez le hamster mâle.

Avantages : La procédure expérimentale mise en œuvre permettra d'évaluer l'activité pharmacologique de molécules en développement, sur la base de l'effet anti-androgénique, sur le hamster mâle.

En effet, le hamster présente, au niveau des oreilles, des glandes sébacées dont la taille est régulée par le taux d'androgène. De ce fait, les mâles ont des glandes sébacées hypertrophiées comparativement aux femelles.

Cette caractéristique est en adéquation avec les pathologies visées (acné, hyperséborrhée...).

Les données ainsi obtenues contribueront au profilage et à la sélection de molécules, à visée thérapeutique chez l'homme pour le traitement de l'acné ou de désordres d'hyperséborrhée.

Domages escomptés : Certaines familles des molécules évaluées peuvent provoquer une réaction inflammatoire susceptible d'entraîner un certain niveau d'inconfort pour les animaux (par exemple : démangeaisons, sensation de chaleur au niveau de la peau) et effet toxique. Ces effets pour l'animal seront maîtrisés par le choix des doses, l'application de protocole de soins, ainsi que le suivi des points limites adaptés.

Lors du traitement topique, le port d'une collerette sera préconisé, celui-ci empêchant l'animal d'ingérer le produit appliqué sur l'oreille. Le port de cette collerette pouvant générer de l'inconfort, une gêne, en particulier pour l'accès à la nourriture et à l'eau de boisson, une étude préliminaire définira les conditions de port de cette collerette à savoir la durée du port (quelques heures, ou journée entière) et les conditions d'hébergement (litière spécifique, nourriture à disposition dans la cage, suivi clinique...).

Méthodes alternatives (principe de remplacement) : A ce jour, il n'existe pas de méthode *in vitro* satisfaisante scientifiquement méthode *in vitro* validée scientifiquement ou test réglementaire *in vitro* reconnu pour évaluer les propriétés modulatrices de la fonction sébacée de molécules.

Choix de l'espèce :

L'espèce hamster est choisie pour les caractéristiques de la peau de la face interne de l'oreille qui présente des glandes sébacées androgéno-dépendantes dont la morphologie est proche de celle des glandes sébacées humaines.

Cette espèce a également été choisie en raison de l'abondance de littérature sur ce modèle et de l'existence d'outils spécifiques pour l'analyse des mécanismes d'action au niveau protéique ou génomique.

Nombre d'animaux : Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet a été réduit à son minimum sans compromettre les objectifs du projet. Selon les méthodes d'analyses utilisées et compte-tenu des variations interindividuelles anticipées, un maximum de 10 animaux par groupe sera nécessaire pour permettre une analyse robuste des résultats générés.

Sur une période de 5 ans, un maximum de 2770 hamsters sera utilisé pour la réalisation des procédures expérimentales, la formation et/ou le maintien des compétences techniques.

Conditions d'hébergement et de soins :

Les hamsters étant, par nature, des animaux solitaires et pouvant se montrer agressifs les uns envers les autres, ils seront hébergés individuellement dès leur réception. Ceci évitera également que les oreilles ne soient abîmées lors de bagarres. Cependant ils garderont un contact visuel et olfactif entre eux.

Les molécules étant appliquées sur l'oreille, les animaux peuvent en ingérer lors de leur toilettage afin de minimiser ce risque, le port d'une collerette est préconisé. Dès lors, les conditions de port seront évaluées et mises en œuvre lors d'une étude préliminaire durant laquelle une surveillance sera apportée sur l'état de santé général de l'animal, en particulier sur le poids.

L'hébergement est enrichi par la mise en œuvre de techniques adaptées aux besoins spécifiques et individuels des animaux leur permettant de reproduire au mieux leur comportement naturel (ex présence de mouchoir papier). La stratégie d'enrichissement est régulièrement revue et mise à jour.

Le suivi des animaux sera assuré quotidiennement et des points limites spécifiques ont été établis afin d'anticiper toute dégradation de l'état de santé général des animaux et, le cas échéant, d'appliquer des protocoles de soins adaptés.

14864 Le syndrome d'apnées obstructives du sommeil touche plus de 20-25% de la population adulte. Il est caractérisé par une fermeture cyclique des voies aériennes pendant le sommeil. Ces pauses respiratoires engendrent une hypoxie intermittente qui constitue un problème important de santé publique car elle est fréquemment associée à une fatigue diurne, une perte de productivité au travail, une survenue plus fréquente d'accidents et des atteintes cardiovasculaires dont les accidents vasculaires cérébraux, conduisant in fine à une mortalité élevée.

Inversement, la prévalence du syndrome d'apnées obstructives du sommeil chez les patients après accident vasculaire cérébral est élevée (jusqu'à 30%), et la présence du syndrome d'apnées obstructives du sommeil pourrait aggraver les dysfonctions cognitives post-accident vasculaire cérébral, notamment en favorisant l'inflammation et le stress oxydant et en altérant la revascularisation cérébrale. Ainsi, le diagnostic et le traitement du syndrome d'apnées obstructives du sommeil post-accident vasculaire cérébral semblent essentiels pour l'amélioration de la condition des patients.

Notre projet vise à étudier, chez l'animal, l'impact de la présence d'une hypoxie intermittente (mimant le syndrome d'apnées obstructives du sommeil) sur la récupération post-accident vasculaire cérébral. De plus, nous investiguerons les mécanismes qui sous-tendent les effets délétères du syndrome d'apnées obstructives du sommeil, dans l'objectif de proposer de nouvelles pistes thérapeutiques reposant sur leur inhibition. Nos recherches pourraient donc améliorer la récupération post-accident vasculaire cérébral.

Notre projet prend en compte la règle des 3R

Remplacement : Les mécanismes délétères perturbant la récupération post-accident vasculaire cérébral ne peuvent que partiellement être étudiés *in vivo* chez l'Homme en effet, si un suivi par imagerie et un suivi fonctionnel peuvent être faits, il n'est pas possible d'accéder aux mécanismes à l'échelle cellulaire. La compréhension de ces mécanismes et la proposition de nouvelles pistes thérapeutiques requièrent donc une approche intégrée. Aucune méthode alternative (notamment en culture cellulaire) ne peut se substituer à l'utilisation des animaux dans ce cadre, car les modèles cellulaires sont trop restreints il n'existe ainsi pas de modèle cellulaire permettant de mimer une ischémie cérébrale.

Réduction Le nombre de rats nécessaire à nos travaux a été réduit au minimum sans compromettre l'interprétation statistique de nos résultats 15 animaux par groupe au final sont prévus, pour un total de 1550 rats sur 5 ans. De plus, nous commencerons ce projet par un groupe préliminaire qui permettra la mise au point du protocole si cette étude préliminaire révèle que le nombre de rats par groupe est surévalué, nous le réduirons de façon à atteindre un nombre d'animaux nécessaire et suffisant.

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

Leur nombre des animaux utilisés pour ce projet a été réduit au minimum nécessaire afin d'obtenir des données suffisantes pour évaluer l'efficacité de cette stratégie et de ces applications thérapeutiques.

14865 En cas d'insuffisance rénale évoluée, les patients doivent avoir recours à l'épuration extra-rénale par des séances d'hémodialyse régulières. Afin de permettre une réalisation facilitée de l'hémodialyse, les chirurgiens vasculaires confectionnent un abord d'hémodialyse sous la forme d'une fistule artério-veineuse (FAV) au bras ou à l'avant bras des patients. La thrombose de la FAV est une urgence médicale. En effet, l'absence de traitement ou une désobstruction trop tardive de la FAV entraîne sa non fonctionnalité et la nécessité de dialyser les patients par la pose d'un cathéter temporaire.

Il existe actuellement 2 possibilités de prise en charge un traitement chirurgical ou bien un traitement endovasculaire afin de désobstruer la FAV. Ces techniques qui ont démontré leur efficacité pour recanaliser la FAV et permettre ainsi la reprise des séances de dialyse sont toutefois contrebalancées par les complications hémorragiques locales qu'elles induisent. De plus, elles nécessitent des professionnels spécifiquement formés, uniquement dans des centres experts incluant des chirurgiens vasculaires et des radiologues interventionnels. Notre objectif est de développer un dispositif non invasif de recanalisation de FAV

L'histotripsie est une technique ultrasonore récente, permettant de fragmenter les tissus biologiques à distance, grâce au déplacement d'un transducteur externe. Appliquée à la FAV thrombosée, cette technique, appelée thrombotripsie, peut permettre la destruction du thrombus en de petits fragments, sans altération des tissus. Ceci autorise une procédure non invasive, locale, rapide, sans traitement pharmacologique associé.

Afin de permettre le développement d'un nouveau dispositif externe de recanalisation de FAV, il convient de s'assurer de la sécurité du dispositif. Les principaux risques identifiés sont l'effraction de la paroi de la FAV et le risque d'une embolie pulmonaire par migration d'un volumineux fragment. Pour cela, l'évaluation *in vivo* nécessite un modèle animal avec une anatomie vasculaire comparable à celle de l'homme. A partir des données de modèles de FAV rapportés dans la littérature, nous souhaitons développer une FAV chez le porc.

Méthodes

Dans l'objectif de suivre la règle des 3R, et donc de réduire le nombre d'animaux utilisés, nous évaluons à 14 le nombre total de porcs nécessaires.

Sous anesthésie générale profonde, une FAV carotido-jugulaire externe latéro-terminale sera réalisée.

Après 7 jours de maturation de la FAV, une thrombose sera réalisée par compression externe en amont et en aval de la fistule et injection intravasculaire de thrombine dans le segment exclu entre les points de compression.

Après confirmation par échographie-Doppler vasculaire du caractère occlusif du thrombus, une recanalisation par ultrasons sera effectuée pour la moitié des porcs (groupe 1), l'autre moitié étant sans procédure de recanalisation (groupe 2). Le réveil sera appliqué pour évaluation du suivi pendant deux semaines. Durant cette période, l'analgésie sera adaptée quotidiennement par le vétérinaire avec surveillance des points limites.

Au terme du suivi à J14, une fistulographie et une échographie-Doppler seront réalisées sous anesthésie générale profonde sur l'animal en vie afin d'évaluer la perméabilité de la FAV et les conséquences de la recanalisation à distance pour le groupe 1. Les animaux seront ensuite tous euthanasiés par surdosage anesthésique à la fin de la procédure.

Le critère principal d'efficacité est le taux de perméabilité de la FAV chez les porcs recanalisés après 7 jours de suivi.

Afin de limiter le plus possible la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, les procédures se dérouleront sous anesthésie générale profonde avec une analgésie préopératoire. Au cours du suivi, l'analgésie sera adaptée quotidiennement par le vétérinaire en charge du projet.

Ce travail permettra de valider l'efficacité et l'innocuité du dispositif ultrasonore non invasif de recanalisation de FAV, dans la perspective d'un développement clinique novateur de la prise en charge de la thrombose de FAV chez l'homme.

14866 Au cours du développement d'une tumeur, les globules blancs vont perdre de leur efficacité à lutter contre les tumeurs car celles-ci mettent en place des systèmes entraînant un épuisement des globules blancs appelés CD8. L'immunothérapie est une révolution dans la prise en charge des patients atteints de cancer. La stratégie la plus couramment utilisée vise à restaurer l'activité des cellules de l'immunité (CD8) anti tumorales grâce à des administrations d'anticorps. Malheureusement, seulement 15 à 20% des patients répondent au traitement. Il faut donc trouver d'autres stratégies pour restaurer l'efficacité des CD8.

Au cours d'une étude précédente, nous avons observé que les CD8 présents dans les tumeurs de souris déficientes pour le gène NLRP3 étaient moins épuisés. NLRP3 est un gène qui agit de plusieurs façons. Pour déterminer de quelle façon agit NLRP3 dans les cellules CD8, nous devons utiliser des souris présentant des déficiences pour d'autres gènes (ASC et CASPASE1) en lien avec les fonctions de NLRP3 et comparer l'effet de leur absence sur l'épuisement des CD8.

Pour cela, nous allons utiliser 10 souris C57Bl6 déficientes pour NLRP3, 10 souris C57Bl6 déficientes pour ASC, 10 souris C57Bl6 déficientes pour CASPASE1 et 10 souris C57Bl6 en contrôle. Ces souris recevront une injection de cellules tumorales en sous cutanées. La croissance des tumeurs sera suivie tous les 2 jours pendant 10 jours puis les souris seront mises à mort, les tumeurs collectées et les CD8 analysés.

La mise en place de ce projet s'est attachée à respecter la règle des 3R. Tout d'abord, les expériences ne seront réalisées que deux fois et les rates, les ganglions et les tumeurs seront analysées sur les mêmes animaux ce qui permet donc de réduire le nombre d'animaux de l'étude. Nous avons fait appel à un méthodologiste afin de déterminer au mieux le nombre minimal de souris requis pour que nos tests statistiques soient suffisamment puissants. L'utilisation des souris de manière indépendante nous permettant d'avoir une réelle puissance statistique. En fonction des résultats obtenus, nous pourrions choisir d'étudier l'une ou l'autre des fonctions moléculaires de NLRP3. Ces expériences seront réalisées *in vitro* (remplacement). Enfin, la totalité des procédures impliquant un inconfort potentiel des animaux (injections sous-cutanées des tumeurs et sacrifice) sera réalisée sous anesthésie permettant ainsi le raffinement de l'étude. Cette étude nécessitera 40 souris.

14867 Ce projet consiste en une étude comparative des bases comportementales et cérébrales du traitement des vocalisations conspécifiques (CV, vocalisations produites par un membre de la même espèce) chez 3 espèces de primates l'humain, le macaque rhésus et le marmouset commun. En effet ces trois espèces utilisent les CV dans leur communication et des résultats récents suggèrent la présence dans le cerveau de chaque espèce de « patches vocaux », régions corticales montrant une activité particulièrement élevée en réponse aux CV.

Le projet a pour but : (1) de comparer les trois espèces au moyen de test comportementaux similaires (catégorisation CV/non-CV, discrimination d'identité du locuteur) via des systèmes de tests automatisés accessibles à volonté par les singes; (2) d'utiliser l'IRM fonctionnelle comme une technique de neuroimagerie peu invasive pouvant être utilisée chez les trois espèces pour mesurer l'activation cérébrale pendant stimulation auditive. Nous comparerons l'activité du cortex en réponse à des vocalisations de marmouset (CV) vs à d'autres sons afin de tester l'hypothèse d'un système de régions cérébrales sensibles aux CV chez les primates – comme c'est le cas pour les « patches de visages » du cortex visuel (régions du cortex sensibles aux visages).

La partie du projet présentée ici concerne les expériences réalisées chez le marmouset. Les animaux consisteront en trois groupes familiaux de marmousets communs (*Callitrix jacchus*), initialement 3 couples reproducteurs puis leur progéniture ($n=20$ individus maximum). Seuls les individus adultes seront inclus dans les expériences d'IRM; tous les individus pourront accéder librement aux systèmes de test comportemental attachés à leur volière.

Ce projet devrait considérablement augmenter notre connaissance de l'architecture fonctionnelle cérébrale responsable du traitement de l'information vocale chez les primates, et permettre de mieux comprendre comment la parole a émergé chez l'humain. Il permettra notamment une comparaison des patrons d'activation cérébrale entre groupes de sujets de taille comparable entre espèces (un manque criant dans la littérature) et une évaluation robuste de la variabilité interindividuelle et de la latéralisation cérébrale des patches vocaux. Les dommages attendus sont relativement minimes, puisque la technique d'imagerie cérébrale utilisée principalement, l'IRM fonctionnelle - est peu invasive. Aucune mise à mort n'est prévue dans ce projet.

Remplacement. Il s'agit d'une étude comparative qui par définition implique de comparer l'humain à d'autres espèces. Il est donc inévitable pour ce projet d'avoir recours aux animaux.

Réduction. Il est prévu d'étudier trois groupes familiaux dont le nombre d'individus total sera limité à $n=20$. Il y a deux raisons essentielles pour ce nombre relativement élevé : (1) Il se rapproche de la taille des groupes observés dans le milieu naturel (typiquement 6-9 individus) permettant des interactions sociales riches qui favorisent le bien-être du groupe, une meilleure survie des nouveaux nés, et sans doute contribue à leur curiosité et motivation pour effectuer les tâches comportementales; (2) Il rend possible une comparaison robuste aux données IRM fonctionnelle humaines sur la base de groupes de sujets de taille comparable, un aspect crucial de cette étude comparative, et est essentiel pour obtenir une évaluation robuste de la variabilité interindividuelle, notamment de la latéralisation cérébrale des patches vocaux.

Raffinement. Les procédures envisagées sont de classe légère, notamment de par l'utilisation d'une technique d'imagerie peu invasive pour laquelle une sédation sera utilisée afin de diminuer le stress de l'animal. Chacun des trois groupes familiaux sera hébergé dans une volière indépendante avec enrichissements comportementaux régulièrement renouvelés.

14868 La prise en compte des cours d'eau dans les projets d'infrastructures linéaires (routes, voies ferrées) s'est longtemps limitée à l'étude des enjeux hydrauliques et aux risques d'inondations. De ce fait, leur franchissement était réalisé par des ouvrages hydrauliques (passages busés) de manière à assurer la pérennité des projets sans se soucier des autres enjeux, en particulier des fonctions biologiques qu'ils assurent corridor de déplacement et milieux de vie pour de nombreuses espèces. Or la réglementation en vigueur impose maintenant sur certains cours d'eau de rétablir une libre circulation piscicole et de nombreux ouvrages sont concernés.

Pour répondre à cette attente, des dispositifs de franchissement, considérant l'hydraulique au niveau de l'ouvrage et les capacités natatoires des poissons, existent. Il est nécessaire aujourd'hui de vérifier in situ l'efficacité de ces dispositifs afin, éventuellement, de les améliorer.

Notre projet consiste à suivre pendant deux années le déplacement de truites au niveau d'un ouvrage hydraulique (buse sous un passage routier), équipé d'un dispositif de franchissement piscicole, afin de vérifier si les individus cherchant à remonter le cours d'eau parviennent à franchir l'ouvrage. Le suivi des poissons sera effectué par marquage des individus avec des puces de type "PIT-tags" (Passive Integrative Transponder) et leur détection par radio-identification au niveau de 3 antennes fixes une à l'aval de l'ouvrage, une à l'entrée et une à la sortie de celui-ci. Cette technologie, peu intrusive pour les individus, et de plus en plus employée dans ce type d'études, permet de marquer durablement et sans dommage des poissons.

L'usage des poissons est un prérequis pour pouvoir évaluer leur comportement face à l'ouvrage. Afin d'aboutir à des résultats statistiquement fiables, il est prévu de marquer au total 620 individus répartis en 3 classes de tailles 360 individus la première année d'étude et 260 la seconde, en considérant que certains poissons marqués la première année serviront également lors de la seconde. La capture d'individus sauvages est nécessaire car les individus de pisciculture possèdent

des comportements et des capacités de nage différents de plus, l'introduction d'individus d'élevage pourrait entraîner une pollution génétique dans la population locale.

Les poissons seront échantillonnés par pêche à l'électricité (engin thermique si possible, ou sur batterie dans les zones difficilement accessibles) à proximité de l'ouvrage suivi. Les espèces non concernées par l'étude seront relâchées immédiatement et les espèces envahissantes détruites selon les indications de l'arrêté préfectoral. Les conditions de stabulation post-pêche seront soignées (bacs perforés et couverts, positionnés en rivière) et les poissons surveillés régulièrement. Une anesthésie précédera les mesures biométriques (taille, poids) et le marquage, qui sera réalisé suite à une petite incision ventrale. Le temps de stabulation post-marquage sera minimisé à quelques heures. Une fois les poissons libérés, leurs passages au niveau de l'ouvrage seront enregistrés en continu. Les résultats de franchissement seront croisés avec les conditions hydrologiques. Au-delà de l'évaluation de l'efficacité du dispositif de franchissement, ce suivi fournira des informations sur les rythmes de migration des truites (proportion d'individus migrants, période, facteurs environnementaux déclenchant,...), y compris à la dévalaison.

14869 Le vomissement est considéré comme un réflexe de protection, activé en réponse à l'ingestion d'une toxine. Il apparaît également dans une grande variété de situations (mal des transports, gestation) pour lesquelles son bénéfice n'est pas toujours expliqué. C'est un acte stéréotypé complexe nécessitant la coordination de nombreux muscles somatiques et viscéraux. L'expulsion du contenu gastro-intestinal, facilité par un profond bouleversement de la motilité digestive, résulte pour l'essentiel de la contraction momentanément synergique des muscles respiratoires. Le déclenchement du réflexe émétique repose sur l'activité d'un groupe de neurones situés au niveau du tronc cérébral. Bien que confortable sur le plan didactique, le concept d'un « centre du vomissement » anatomiquement circonscrit est définitivement abandonné. En effet, les régions bulbaires pouvant contenir les neurones impliqués dans l'intégration des messages afférents et la genèse de l'activité motrice émétique correspondent à l'area postrema, au noyau du tractus solitaire, au noyau dorsal moteur du nerf vague et à la formation réticulée bulbaire. Ce réseau de neurones peut être activé par un grand nombre de signaux afférents (nerveux ou humoraux) provenant du tube digestif, du cœur, de la cavité oropharyngée, du système vestibulaire, de l'area postrema ou des structures nerveuses supérieures.

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

Compte tenu des éléments évoqués plus haut, et dans la mesure où ces effets secondaires ne sont pas limités à quelques rares pathologies ou à un nombre restreint de classes pharmacologiques, l'étude des propriétés émétiques de nouveaux candidats médicaments doit être envisagée aussi tôt que possible dans le processus de développement du médicament. Dans cette optique, le modèle de nausées et vomissements chez le furet a été développé depuis plusieurs années au sein de notre société et ce modèle a déjà été accepté par le comité d'éthique et le ministère depuis 5 ans. Une étude pharmacocinétique est souvent réalisée en parallèle afin d'étudier le devenir du médicament dans l'organisme, c'est pourquoi elle sera intégrée à ce projet.

La complexité du réflexe émétique, tant d'un point de vue de la diversité des voies d'activation que des médiateurs et des récepteurs mis en jeu, nécessite une évaluation sur animal entier. Alors que

les rongeurs classiquement utilisés au laboratoire ne sont pas capables de vomir, le furet reste le modèle de choix pour l'étude du vomissement et sera l'espèce utilisée dans le cadre de ce projet. Le nombre d'animaux inclus dans ce projet a été déterminé par un calcul de N 49 par série expérimentale pour un total de 10 séries sur 5 ans, soit 490 animaux. Dans la mesure où cela est compatible avec le bien-être des animaux et le projet, les animaux seront ré-utilisés (réduction). Les animaux sont hébergés par groupe de 2 à 4 dans des modules de tailles adaptées avec un enrichissement diversifié. De plus, une surveillance quotidienne et un programme de sociabilisation sont mis en place. Le point limite a été fixé sur la base de l'évaluation de signes caractéristiques de la douleur mais aucune douleur chronique n'est attendue et la sensation de nausées et de vomissements, si elle est ressentie, s'estompe généralement au bout de quelques heures.

14870 La découverte des effets antidépresseurs rapides de la kétamine a éveillé l'espoir de nouveaux traitements de la dépression à efficacité accélérée. Alors que les antidépresseurs classiques mettent plusieurs semaines à agir et sont inefficaces dans plus de 30% des cas, une seule dose de kétamine entraîne un effet quasi-immédiat qui persiste pendant plusieurs jours. Malheureusement, le mode d'action de la kétamine reste méconnu et son utilisation clinique est limitée par des effets secondaires importants (psychoses). Notre objectif au cours de ce projet est de comprendre par quels mécanismes la kétamine supprime les symptômes de la dépression pour pouvoir à terme proposer des traitements alternatifs plus sûrs. La kétamine est un anesthésique qui agit en bloquant des récepteurs du glutamate, le principal neurotransmetteur excitateur du cerveau. Il semble par contre que son activité antidépresseur passe par ces mêmes récepteurs mais sans nécessiter leur blocage. Nous proposons que cette activité antidépresseur de la kétamine implique plutôt un changement d'organisation des récepteurs du glutamate à la surface des neurones. Pour tester cette hypothèse, nous allons explorer si le fait de favoriser ou d'empêcher ces réarrangements impacte les effets antidépresseurs de la kétamine. Nous allons pour cela mimer la maladie en utilisant un modèle animal de dépression chez le rongeur basé sur le stress social, où le conflit entre un rat dominé et un rat dominant est utilisé pour provoquer un stress émotionnel et psychologique qui conduit à la dépression chez l'animal dominé. L'administration chez ces animaux de kétamine et de molécules visant à favoriser ou limiter son effet antidépresseur en jouant sur l'organisation des récepteurs du glutamate seront suivies de tests comportementaux pour étudier l'évolution des symptômes associés à la dépression (anxiété, perte de motivation, incapacité à ressentir des émotions positives). Les approches comportementales de ce projet pour évaluer des symptômes de la dépression nécessitent d'utiliser des animaux. Aucune méthode alternative actuelle (*in vitro*, modélisation) ne permet de reproduire la complexité de l'animal se comportant (remplacement). Cependant, la règle des 3R a été observée lors de la conception du projet et une planification précise des expériences a été établie afin de réduire au minimum le nombre d'animaux inclus dans cette étude, tout en ayant des effectifs suffisamment larges statistiquement. Nous proposons ainsi un projet portant sur 640 rats (réduction), avec un nombre de 12 animaux par groupe déterminé comme nécessaire pour l'analyse des tests comportementaux et des approches électrophysiologiques et biochimiques utilisés. Une attention permanente sera portée au bien-être des animaux avant et pendant les protocoles, notamment en assurant un enrichissement adéquat de leur cages d'hébergement (raffinement) : papier tressé pour les mères, tunnels en carton pour que les rats puissent exprimer leurs comportements naturels. Ils seront surveillés quotidiennement par des personnels compétents et formés. Les douleurs consécutives à la chirurgie seront soulagées à l'aide des molécules les plus adaptées au protocole et à l'état des animaux. Aucune des données recueillies sur les molécules à visée thérapeutique injectées par voie intrapéritonéale ou intra-cérébro-ventriculaire ne prédisent que ces injections seront douloureuses. Néanmoins, l'état des animaux sera particulièrement surveillé durant le temps de ces injections et des mesures adaptées seront prises dans le cas contraire. Les tests comportementaux utilisés dans ce projet ne provoquent pas de douleurs et sont peu contraignants pour les animaux. Des points limites suffisamment prédictifs sont définis pour limiter la souffrance tout au long de la vie de l'animal. En cas de souffrance ou de détresse persistante, les animaux seront mis à mort dans des conditions qui évitent souffrance et stress.

14871 La sclérose en plaques (SEP) est une maladie auto-immune affectant le système nerveux central (SNC, comprenant le cerveau et la moëlle épinière). Dans une maladie auto-immune, le système immunitaire se dérègle et attaque l'organisme. Dans le cas de la SEP, le système immunitaire attaque la gaine de myéline qui entoure les fibres nerveuses et permet la transmission des messages nerveux. Les lésions dans la gaine de myéline entraînent des troubles moteurs (fonctionnement des membres), sensitifs (fonctionnement des sens) et cognitifs (fonctionnement mental, mémoire, apprentissages). Cette maladie touche plus de 2,3 millions de personnes dans le monde, avec environ 5000 nouveaux cas diagnostiqués en France chaque année.

Il existe plusieurs formes cliniques de la SEP, catégorisées selon la progression et l'aggravation des attaques et de l'altération des fonctions neurologiques. La première forme, la plus courante, est la forme récurrente-rémittente avec poussées (RR-SEP) qui concerne 80% des patients au début de la maladie. La deuxième forme est dite progressive primaire. Cette forme concerne 20% des patients avec une évolution de la maladie irréversible se traduisant principalement par des atteintes motrices. La forme RR-SEP évolue parfois vers une forme dite secondaire progressive. Dans ce cas, le handicap des patients s'accroît lentement et de façon irréversible. Ces deux dernières formes sont dites chroniques. Les patients atteints de SEP ont une qualité de vie extrêmement altérée selon l'intensité et la fréquence des poussées.

A ce jour, les traitements disponibles sont dédiés à la forme RR-SEP et permettent de réduire les signes cliniques en bloquant l'inflammation. Ces traitements ralentissent la progression de la maladie, mais leur efficacité est limitée. Il n'existe pas de traitement efficace contre les formes chroniques de SEP. La découverte des cellules T régulatrices (Treg) a permis d'initier de nouvelles stratégies thérapeutiques, particulièrement pour les formes chroniques de SEP.

Il existe de nombreux modèles expérimentaux chez l'animal, comme par exemple l'Encéphalite Auto-immune Expérimentale (EAE) induite chez la souris. Dans ces modèles, les souris présentent une paralysie progressive des membres arrière puis des membres avant, accompagnés de la destruction de la gaine de myéline (démýélinisation). Les souris développent donc les signes d'atteintes neurologiques qui ressemblent aux signes cliniques de la SEP chronique chez l'humain (difficultés motrices). Pour limiter l'inconfort de ces animaux, un accès facilité à la nourriture et à l'eau est prévu (croquettes humidifiées et gel hydrique) dès l'apparition des symptômes de l'EAE. Dans ces modèles expérimentaux, il a été montré que ces cellules Treg étaient capables de réduire l'inflammation. De plus, il a également été démontré que les Tregs étaient capables de stimuler les processus de remýélinisation (réparation des lésions de la myéline), réduisant ainsi le nombre de lésions au niveau du SNC. Nous mettrons en place ces modèles expérimentaux dans deux souches de souris à phénotype non-dommageable (C57BL/6 ou ABH Biozzi) et 2 souches de souris à phénotype dommageable (SJL/J et NSG).

Afin de rendre cette approche encore plus efficace, nous avons décidé de modifier génétiquement les cellules T régulatrices. Notre objectif est que ces cellules Treg génétiquement modifiées puissent agir de manière spécifique et locale au niveau du SNC. Nous espérons que ce ciblage précis de l'activité des cellules Treg permettra de réduire leur toxicité potentielle.

Afin d'obtenir les données précliniques demandées par les autorités sanitaires avant d'entrer en phase de test chez l'humain, nous testerons cette nouvelle thérapie cellulaire dans les modèles d'EAE chez la souris. Le projet consiste donc à évaluer le bénéfice thérapeutique des Tregs génétiquement modifiés ainsi que leur distribution et éventuelle toxicité. Les règles d'expérimentation sont comme suit (remplacer) l'emploi des modèles *in vivo* est nécessaire au projet car il n'existe pas à l'heure actuelle de méthodes alternatives permettant de reproduire *in vitro* la complexité des mécanismes immunologiques mis en place lors des maladies inflammatoires du SNC. (Raffinement) Nous veillerons à optimiser les conditions d'hébergement pour limiter l'inconfort des animaux souffrant de paralysie des membres. Un accès facilité à la nourriture et à l'eau est prévu (croquettes humidifiées et gel hydrique) dès l'apparition d'animaux affaiblis et de paralysie. Dans une approche éthique, nous prévoyons de limiter au maximum le nombre d'animaux avec des scores cliniques sévères et mettre en place des points limites adaptés. Pour les actes de prélèvement invasifs comme les prélèvements sanguins, nous utiliserons un anesthésique local pour limiter la douleur. (Réduction) afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, chaque groupe

contiendra le nombre de souris minimum indispensable à l'obtention de résultats statistiquement significatifs. Notre stratégie expérimentale est choisie pour réduire le nombre d'animaux malades en choisissant une souche de souris sensible à l'induction de l'EAE. De plus, seuls les Tregs génétiquement modifiés montrant l'activité désirée *in vitro* seront testés *in vivo* afin de réduire le nombre de souris utilisé. Un nombre total de 6284 souris sera nécessaire.

14872 Les dysfonctionnements du système nerveux central affectent un nombre croissant de personnes, notamment en raison du vieillissement de la population et de l'allongement de l'espérance de vie. Ceux-ci peuvent être traumatiques (e.g., accidents, lésions vasculaires), psychiques (e.g., autisme, dépression, anorexie, troubles bipolaires), neurodégénératifs (e.g., Parkinson, Alzheimer, Huntington), ou liés à des tumeurs (e.g., glioblastomes, médulloblastomes, neurinomes). De fait, il y a un enjeu majeur à développer des nouveaux traitements pour compenser ces dysfonctionnements. L'une des stratégies consiste à utiliser des implants capables d'enregistrer l'activité du tissu neuronal et de le stimuler pour l'activer fonctionnellement. Par exemple, des études récentes montrent que ces implants permettent de récupérer des signaux du cortex moteur de patients tétraplégiques afin de contrôler un bras robot. Cependant, si les implants actuels permettent déjà de réaliser cette tâche, l'apprentissage est long et l'implant provoque souvent une inflammation à long terme, empêchant alors le contrôle du robot. Dans le cas d'implant rétinien, ils sont capables de stimuler le tissu de la rétine afin de redonner une vision partielle aux patients. Cependant, un des problèmes est le détachement de l'implant au tissu réduisant ainsi son efficacité à long terme. C'est pourquoi, nous proposons de développer de nouveaux micro-implants ultra-fins, souples, nanostructurés et biocompatibles, permettant de pallier à ces problèmes. Ils permettront de faciliter l'apprentissage et l'utilisation de cette technologie prometteuse à plus long terme et d'améliorer l'adhésion au tissu pour le développement de nouveaux implants rétiens plus performants. Au vu des deux exemples cliniques précédents et afin de faciliter leur utilisation future chez le patient, ces implants devront être capable d'enregistrer et de stimuler l'activité neuronale avec une meilleure stabilité par rapport à l'existant, ce qui sera réalisé grâce à une haute biocompatibilité (haute adhésion au tissu, pas d'inflammation sur le long terme). Quatre types d'implant seront testés et leur efficacité sera suivis sur 3, 6 mois ou jusqu'à un maximum de 3 ans afin de déterminer leur biocompatibilité et leur capacité à enregistrer l'activité neuronale à long terme. Leur fonctionnalité pour la stimulation neuronale sera également évaluée.

Ce projet est composé de 3 procédures expérimentales et requerra l'utilisation d'un maximum de 280 rats femelles et 280 rats mâles sur une période de 5 ans.

Remplacement Pour limiter nos investigations sur les animaux, la biocompatibilité des implants sera testée *in vitro*. Néanmoins, des tests chez le rat adulte sont nécessaires pour valider *in vivo* la biocompatibilité des implants ainsi que leur capacité à enregistrer et stimuler de manière stable les neurones au cours du temps.

Réduction Ce nombre d'animaux a été déterminé de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisé tout en en gardant suffisamment pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées.

Raffinement Tous les implants seront testés sous anesthésie avant que les animaux soient éventuellement éveillés. Pour veiller au bien-être des animaux, la santé des animaux sera surveillée quotidiennement tout au long des expérimentations et évaluée grâce à une grille codifiant le niveau de douleur. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

14873 Le cancer constitue la seconde cause de mortalité dans le monde avec près de 8.8 millions de décès en 2015 selon l'Organisation Mondiale de la Santé. Les traitements courants comprenant chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie sont lourds pour les patients et leurs résultats ne sont pas garantis. La raison principale étant qu'il est aujourd'hui encore très difficile de cibler uniquement mais intégralement les cellules cancéreuses.

Les bactéries utilisées dans cette étude ont pour objectif de cibler les tumeurs et de délivrer en leur sein, des molécules anti-cancéreuses. Pour cela, ces bactéries ont été modifiées afin de réduire

leur virulence, ainsi elles seront inoffensives dans un environnement sain (système immunitaire normal) mais proliféreront dans un environnement tumoral (système immunitaire perturbé). Ce qui en fait d'excellents transporteurs de molécules anti-cancéreuses.

Le but de cette étude est d'améliorer la tolérance de l'organisme face à ces bactéries qui demeurent étrangères au système immunitaire. Pour cela, une première dose inférieure à la dose d'effet de la bactérie sera injectée par voie intraveineuse chez le lapin sain.

Des études de toxicité aiguë et chronique ont déjà été réalisées chez le lapin sain et ont permis de sélectionner les doses qui seront utilisées lors de ce projet.

14 lapins seront nécessaires à la réalisation de cette étude

- Groupe 1 (première dose faible) 6 Lapins

- Groupe 2 (première dose équivalente aux suivantes) 6 Lapins

- 2 lapins supplémentaires sont prévus dans le cas où des animaux auraient mal supporté le transport (perte de poids, prise alimentaire faible, troubles digestifs). Ces 2 lapins permettront d'améliorer la puissance statistique des résultats obtenus si l'ensemble des animaux arrivent en bonne santé.

La mise en place de ce projet s'est attachée à respecter la règle des 3R

Remplacer Une partie des résultats préliminaires a été réalisée *in vitro* mais la complexité d'un être vivant ne peut pas être mimée en laboratoire nécessitant l'utilisation de modèles animaux.

Réduire La différence de toxicité attendue entre les deux méthodes d'administration étant faible, 6 animaux par groupe au minimum seront nécessaires.

Raffiner Les injections intra-veineuses impliquant un inconfort potentiel des animaux seront réalisées par du personnel formé et expérimenté. De plus, dans un souci de raffinement, la méthode de prise de température via une puce implanté sous la peau des animaux sera rapide et sans stress ni douleur contrairement à ce qu'implique une prise de température rectale. Des points limites ont également été définis et leur atteinte entraînera la mise à mort précoce des animaux pour limiter au maximum leur souffrance. En fin d'expérience l'ensemble des animaux seront mis à mort sous anesthésie générale. Les animaux seront hébergés dans un environnement adapté et enrichi.

14874 La prévalence des maladies hépatiques non alcooliques (ou Non Alcoholic Fatty Liver Diseases, plus communément appelées par leur acronyme anglais NAFLD) est en nette augmentation depuis 2 ou 3 décennies, parallèlement à celle de l'obésité. Sous ce terme de NAFLD est regroupé un large spectre d'atteintes hépatiques avec des degrés de sévérité variables, allant de la simple accumulation de lipides dans le tissu hépatique (stéatose) à un dysfonctionnement de l'organe (stade fibrotique ou cirrhotique). C'est pourquoi, différentes méthodes d'imagerie de la pathologie se sont développées afin notamment d'identifier son stade de développement. Toutefois si le diagnostic de la fibrose ou de la stéatose est aujourd'hui réalisable grâce à différentes modalités, le suivi de l'inflammation hépatique de manière non invasive est aujourd'hui impossible. Or, l'inflammation est au cœur des mécanismes d'évolution des NAFLD, et il serait en particulier un facteur aggravant, de mauvais pronostic, il est donc primordial de pouvoir évaluer ce paramètre.

Nous nous proposons d'évaluer un nouvel agent d'imagerie spécifique de l'inflammation. Cet agent d'imagerie nucléaire fait actuellement l'objet d'un transfert en clinique mais pour une indication autre que l'inflammation hépatique, et nous souhaitons déterminer s'il pourrait également avoir un intérêt pour l'imagerie de l'inflammation dans les NAFLD. Il n'existe pas à l'heure actuelle de modèle animal mimant parfaitement la pathologie humaine, mais plusieurs sont décrits et peuvent encore être affinés.

Lors d'une précédente étude conduite chez la souris, la preuve de concept de la faisabilité de l'imagerie du foie avec cet agent d'imagerie a été réalisée en utilisant un modèle d'inflammation hépatique aiguë, induite par un régime alimentaire MCD largement décrit dans la littérature, carencé en deux acides aminés (la Méthionine et la Choline). Cette étude a permis de démontrer que l'agent d'imagerie permet effectivement de visualiser et de quantifier de manière non invasive l'inflammation hépatique. Cependant ce modèle MCD ne présente pas toutes les caractéristiques

de la pathologie humaine et notamment les souris perdent du poids. Suite à cette preuve de concept, nous souhaitons poursuivre l'évaluation sur des modèles murins beaucoup plus proches, en termes de physiopathologie des NAFLD, de celle observée en pratique clinique. Ainsi nous avons étudié avec succès l'inflammation hépatique de souris nourries avec un régime enrichi en lipides et en fructose (régime DIN). Cependant ce modèle est très long à mettre en œuvre (20 semaines de régime) et nous nous proposons d'évaluer cette fois-ci un autre modèle qui mélange un peu les deux précédents avec une carence en acide aminé (la choline seulement) et un régime enrichi en lipides (high fat diet). Ce modèle (CDAA HFD) a déjà été décrit et utilisé dans la littérature, et il permet d'obtenir une stéatohépatite en seulement 4 semaines, sans perte de poids. Les symptômes induits sont donc de gravité légère, toutefois ce régime ayant été beaucoup moins utilisé que le régime MCD jusqu'ici, de nombreuses études post-mortem seront nécessaires pour sa validation.

Au total 50 souris seront utilisées.

Tout au long des études *in vivo*, nous respecterons la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). Nous limitons le projet aux seules expériences considérées comme absolument indispensables chez l'animal. Ces animaux seront hébergés par groupe, en cages avec enrichissement du milieu de vie. Les animaux seront suivis quotidiennement afin de contrôler leur bien-être. Le régime alimentaire n'entraînera pas de phénotype dommageable. Le protocole d'imagerie qui sera mis en œuvre n'entraînera pas de douleur, souffrance ou angoisse en dehors d'un stress bref et modéré lié aux injections du radiotracer selon les bonnes pratiques vétérinaires.

14875 Le cerveau des mammifères est composé de cellules appelées neurones. La particularité remarquable des neurones est de communiquer entre eux via des structures élémentaires les synapses. Cependant, l'efficacité de ces échanges peut évoluer à la hausse ou à la baisse (cas de la dépression à long terme ou LTD) en fonction de la sollicitation des réseaux concernés et des stimuli reçus. Ces modifications correspondent au phénomène de plasticité synaptique et surviennent dans les minutes qui suivent le stimulus déclencheur.

A plus long terme (quelques heures après le stimulus), il a été rapporté que les régions du neurone où se situent la majorité des synapses, les épines, subissent des variations de taille et de nombre. Ceci correspond à la plasticité structurelle. Dans le cas particulier d'un stimulus entraînant une LTD, le nombre d'épines diminue, on parle alors de sélection synaptique. Cependant, la compréhension du lien entre plasticité synaptique et structurelle est incomplète, notamment concernant la nature de l'interaction. De plus, leur implication dans le comportement et leurs conséquences visibles dans la « vie de tous les jours » commence à être mise en évidence mais reste peu connue.

De plus, l'implication de la plasticité neuronale dans des pathologies neurodéveloppementales et neurodégénératives (troubles du spectre autistique, maladie d'Alzheimer par exemple) a été identifiée. Une compréhension de ce phénomène est donc un point décisif dans la connaissance et la lutte contre ces pathologies, représentant dès lors un véritable enjeu sociétal et de santé publique.

Notre projet étudiera donc l'interaction entre plasticités synaptique et structurelle. Nous nous focaliserons sur la LTD et sélection synaptique ainsi que l'implication comportementale et adaptative de ces mécanismes. Nous utiliserons des techniques d'imagerie de pointe afin de suivre et mesurer différents paramètres neuronaux.

Justification du respect de la règle des 3R.

Remplacer : ce protocole nécessite l'utilisation d'animaux. En effet l'ensemble du projet repose sur l'idée de mettre en évidence le rôle de la plasticité neuronale dans la réorganisation de réseaux neuronaux et de comprendre son impact physiologique. Le projet ne peut donc se faire que sur des animaux vivants, des souris adultes "Mus musculus".

Réduire : le nombre d'animaux est calculé par l'estimation de la variance observée avec ce type de donnée permettant d'atteindre une signification statistique. Le nombre d'animaux est de 410 sur 3 ans. Chaque groupe expérimental est accompagné d'un groupe contrôle.

Raffiner : Afin de réduire au minimum la souffrance des animaux, les procédures suivantes sont mises en place : Les animaux proviennent d'un éleveur agréé. À leur arrivée, les animaux sont hébergés en cages collectives, garnies de litières leur permettant de reproduire un comportement

naturel de fouissage et d'un enrichissement constitué d'un nid végétal et de tubes de cartons, pour leur permettre de construire des nids et de jouer et de ronger. Ces cages offrent aux animaux un espace important pour se redresser. Après un premier contrôle de leur état de santé, les animaux bénéficient d'une période d'acclimatation. Les animaux sont surveillés quotidiennement avec une surveillance renforcée après chirurgie.

Afin de réduire la douleur, les procédures expérimentales sont réalisées sous anesthésie et en présence d'une couverture analgésique. Un suivi post opératoire est réalisé durant 4 jours. Si un signe de douleur apparaît, un protocole de nursing est mis en place et une injection de NaCl et/ou d'analgésique est réalisée.

Des points limites suffisamment précoces sont définis pour éviter des souffrances aux animaux avec la mise en place de mesures pour les soulager comme une réhydratation, le réchauffement, une nourriture adaptée, des traitements vétérinaires si nécessaire.

14876 L'insuffisance rénale chronique (IRC) correspond à des atteintes rénales qui le plus souvent évoluent vers une fibrose favorisant la lésion des tubules rénaux. Ces lésions entraînent la perte de la fonction rénale. Cette maladie dont la prévalence est de 1 patient sur 1000 habitants s'avère donc un enjeu de santé publique.

Parmi les acteurs associés à la progression de la fibrose rénale, le récepteur nucléaire Farnesoid X receptor a été identifié comme une molécule pouvant protéger de cette atteinte. En effet, son absence promeut la fibrose chez les souris et l'étude de biopsies humaines a permis de montrer que la diminution de FXR précède et permet de prédire l'apparition d'IRC.

Ce projet vise à évaluer l'efficacité d'une molécule agoniste de FXR dans un modèle de souris génétiquement modifié chez lequel nous pouvons induire une fibrose rénale contrôlée dans le temps. L'induction de la fibrose se fera par gavage au tamoxifène des souris ce qui entraîne l'inactivation du facteur de transcription Hnf1beta. Les souris seront ensuite gavées avec soit la molécule agoniste de FXR, soit avec un placebo pour une durée de 21 jours.

Un prélèvement de sang en intracardiaque sera réalisé sous anesthésie générale afin d'éviter la souffrance et l'angoisse avant le sacrifice des animaux 24 jours après l'inactivation du gène. L'urine et les reins des animaux seront prélevés en post-mortem pour analyses.

Afin de respecter le principe des 3R, la molécule agoniste a déjà été testée sur des cultures cellulaires et nous permet d'envisager une gamme d'efficacité sans toxicité pour les animaux. Nous réduisons ainsi le nombre d'animaux nécessaires. D'autre part, il a été démontré que la validité de l'analyse statistique de la biochimie sanguine et urinaire requiert un minimum de 20 animaux par groupe. C'est donc cette valeur que nous nous sommes fixée pour cette étude. Tout au long de la procédure, les animaux seront surveillés et des points limites ont été établis permettant d'anticiper la mort de l'animal en cas de souffrance. Cette étude implique 140 souris.

Cette étude vise à atténuer voire à inverser la fibrose rénale induite chez un modèle génétique murin et représente un enjeu thérapeutique quant au traitement de l'insuffisance rénale chronique.

14877 Dans le processus de développement des médicaments, après avoir démontré l'efficacité des molécules candidates sur des modèles *in vitro*, il convient de préparer au mieux le passage chez l'Homme. Pour ce faire la molécule doit être caractérisée et son métabolisme défini. Si bon nombre de métabolites peuvent être identifiées dans des modèles cellulaires, leur quantification passe souvent par des modèles animaux plus représentatifs de la physiologie. Par ailleurs, la cinétique et l'élimination du produit parent et/ou de ses métabolites doivent être caractérisées pour anticiper au mieux les doses et formulations administrées dans le futur à l'Homme. Ces résultats permettent donc de comparer l'intérêt et le potentiel des différents candidats d'un même projet et de choisir au mieux l'espèce la plus représentative du métabolisme humain pour l'utiliser dans le développement préclinique puis de faciliter l'extrapolation des doses actives et toxiques avant passage en phases cliniques. Le choix de l'espèce reste conditionné par le mécanisme d'action de la substance étudiée. L'effectif maximal global utilisé dans ce projet ne dépassera pas 3920 animaux sur 5 ans dont 150 chiens et 350 primates non-humains pour les prélèvements et matrices biologiques, et pour la

réalisation d'études de pharmacocinétique 180 chiens, 240 primates non-humains, 1500 rats et 1500 souris. Lors de la réalisation des études de pharmacocinétique, la diminution du nombre d'animaux testés passe par l'utilisation de ceux-ci à plusieurs reprises dans la même étude, dans des études différentes mais aussi par la mise en place de méthodes de dosage spécifiques permettant de prélever des volumes sanguins plus faibles contribuant ainsi à une diminution du nombre d'animaux utilisés. Ces études techniques sont réalisées par du personnel formé et compétent à la demande des différents axes thérapeutiques.

De plus, le contenu de ces études intègre les impératifs éthiques tels que les modalités d'administration et de prélèvement, l'hébergement et l'enrichissement du milieu spécifique pour chaque espèce étudiée mais aussi la prévention de toute douleur, détresse ou inconfort chez l'animal. Les expérimentateurs sont formés et habilités aux gestes techniques impliquant l'utilisation des animaux et à l'observation des signes cliniques relatifs au bien-être de l'animal tout au long de son existence. Les gestes techniques susceptibles de provoquer de la douleur (par exemple prélèvement ou biopsie) sont réalisés sous anesthésie. Enfin, la réutilisation d'animaux ou le placement dans certains cas, s'effectue dans le cadre de nos procédures internes et après approbation vétérinaire contribuant ainsi à l'application de la règle des 3R remplacement, réduction, raffinement.

14878 La diversification des espèces de poissons d'élevage est un enjeu majeur permettant le développement d'une pisciculture durable et respectueuse de l'environnement tout en répondant à la demande grandissante des consommateurs. Cette approche implique la domestication de nouvelles espèces et nécessite la compréhension de leurs besoins nutritionnels et physiologiques. Ceci afin de permettre le succès de leur reproduction en captivité. La domestication de la perche commune (*Perca fluviatilis*) est possible depuis la mise en place d'un programme mimant les fluctuations naturelles de la température et la photopériode et permettant d'induire et maintenir leur cycle de reproduction (période aussi appelée gamétogénèse correspondant à la préparation des ovules et spermatozoïdes). Cependant, le succès reproducteur s'avère aléatoire. Des défauts de développement des embryons sont souvent observés. Ils peuvent être liés à des facteurs très variés parmi lesquels l'alimentation. Plusieurs études ont montré l'importance de la qualité et de la quantité des lipides d'origine alimentaire sur la qualité des œufs et le succès du développement des embryons chez les poissons. La perche commune est connue pour utiliser des réserves lipidiques accumulées avant l'induction de la gamétogénèse pendant une période que l'on peut qualifier de période de préparation. Notre première expérience a permis d'identifier une formulation (composition) de granulés répondant aux besoins nutritionnels et énergétiques des perches pour obtenir un bon succès de reproduction. De plus, cet aliment permettrait aux pisciculteurs de s'affranchir de l'ajout d'invertébrés marins congelés (coûteux et contraignants). De manière intéressante, nos résultats suggèrent également que les perches utilisent non seulement les réserves accumulées lors de la phase de préparation, mais également les lipides présents dans la nourriture au cours du cycle. Nous voulons maintenant approfondir nos connaissances sur l'importance relative des lipides accumulés lors de la phase de préparation par rapport aux réserves apportées lors du cycle.

Pour répondre à ce questionnement, 3 lots de perches seront étudiés. Le premier lot sera nourri avec un taux de rationnement élevé tout au long de la phase de préparation ensuite à satiété jusqu'à la fin des pontes. Le deuxième lot recevra pendant la phase de préparation une quantité d'aliment suffisante pour assurer leur bonne santé tout en accumulant des réserves moins importantes que pour les poissons du premier groupe (alimentation restreinte). Ce lot sera ensuite nourri à satiété tout au long du cycle de reproduction pour déterminer si les femelles peuvent compenser le manque de réserves accumulées lors de la phase de préparation. Enfin, un troisième lot de poissons aura une alimentation restreinte pendant la phase de préparation et les 2 premiers mois du cycle de reproduction. Pendant les 7 mois suivant (jusqu'à la fin du cycle de reproduction), ces poissons seront nourris à satiété pour étudier l'effet d'une compensation tardive des apports alimentaires. Trois bassins seront utilisés par condition. Comme la perche est un animal grégaire, il est nécessaire d'avoir des groupes conséquents d'individus tout au long du cycle de reproduction

pour nous assurer que le stress éventuel dû à la réduction du groupe n'interfère pas avec la progression du développement gonadique (raffinement). Au total 1040 poissons seront étudiés dans cette expérience (54 pendant la période de préparation et 990 pendant le cycle de reproduction). Les 990 poissons vont nous permettre de faire des groupes assez grands en tenant compte de l'ensemble des conditions en plus du sex-ratio (rapport entre le nombre mâles et femelles). Il a aussi été jugé optimal pour obtenir un nombre de pontes statistiquement suffisant (raffinement et réduction).

Au cours de la période de préparation, certains animaux subiront un régime alimentaire restreint (procédure N°1) pour préparer les réserves des poissons à la suite de l'expérimentation. Avant l'induction du cycle de reproduction, les poissons seront tous anesthésiés (raffinement) pour poser une micropuce électronique permettant leur identification et leur suivi individuel (procédure n°2). A ce moment, ils seront également sexés par échographie (procédure n°3). En effet, il n'est pas possible de distinguer morphologiquement les perches mâles et femelles. Ces deux procédures nous permettront de ne prélever que des femelles au cours des prélèvements mensuels grâce aux puces qui nous permettront d'identifier les femelles avant de procéder aux expériences (réduction et raffinement). Le cycle de reproduction pourra alors être induit. A chaque prélèvement mensuel, les poissons seront anesthésiés (raffinement) pour procéder à des prélèvements sanguins (procédure n°4) puis seront sacrifiés pour effectuer des prélèvements d'organes. Ces derniers nous permettront de suivre la progression du développement des ovaires ainsi que leur contenu lipidique et le statut physiologique des poissons tout au long du cycle de reproduction (5 femelles/bassins/mois). Un mois avant la saison des pontes, toutes les femelles seront prélevées, anesthésiées (raffinement) et canulées (introduction d'une canule par l'orifice génital pour prélever quelques cellules et prédire le moment de la ponte) (procédure n°5). Les femelles seront alors regroupées en fonction de l'état de maturité de leurs gonades en groupes homogènes. Les femelles d'un même groupe pondront au même moment. Cette procédure nous permettra ainsi d'éviter de stresser des poissons pendant la saison de ponte (raffinement). Les femelles prêtes à pondre seront stimulées par une légère pression abdominale. Cette procédure permettra de libérer les pontes (procédure n°6). De la même manière les mâles seront stimulés pour prélever du sperme (procédure n°6). Les pontes seront alors fécondées artificiellement et le succès de la reproduction sera suivi en étudiant la survie des embryons au cours de leur développement ainsi que l'apparition éventuelle de malformations. Ce travail portant sur l'alimentation et la reproduction de la perche ne peut être remplacé par des expérimentations *in vitro* (remplacement). Les résultats permettront (i) de rationaliser et optimiser les protocoles d'alimentation des géniteurs adultes et (ii) d'améliorer les connaissances sur l'origine des apports énergétiques dans les œufs de poissons.

14879 La biodisponibilité des acides aminés, fraction digérée rendue disponible pour les métabolismes, du lait maternel de femme (LM) reste mal connue, notamment pour le tryptophane. Le tryptophane, acide aminé indispensable pour la synthèse protéique, est également essentiel pour la production de métabolites bénéfiques au développement du nourrisson, notamment au niveau du cerveau (ex sérotonine, « hormone du bonheur ») et de la maturation intestinale (ex indole). Cet acide aminé est essentiel, il ne peut être produit par l'organisme et doit donc être apporté par l'alimentation.

La teneur en tryptophane est déterminante pour calculer la teneur en protéines des préparations pour nourrissons (PPN). Ainsi, une meilleure connaissance de la biodisponibilité du tryptophane, à la fois dans le LM et dans les PPN, permettrait d'optimiser les teneurs en protéines des PPN. Par ailleurs, une meilleure connaissance de l'influence du tryptophane sur la production de métabolites impliqués dans le développement du nourrisson est nécessaire pour améliorer les impacts physiologiques des PPN.

Seules deux études se sont intéressées à la biodisponibilité des acides aminés dans le LM. Elles ont souligné la variation de la biodisponibilité des acides aminés (AA) et montrent que les AA ne sont pas tous 100% biodisponibles dans le LM.

L'objectif de ce projet de recherche est de mesurer la biodisponibilité des acides aminés, particulièrement celle du tryptophane, dans les LM et PPN, par distribution de ces différents aliments à un modèle de mini-porc, utilisé comme modèle du nourrisson.

Ce projet comprend deux étapes principales

-La première étape consistera en la mesure de la biodisponibilité des AA dans le LM et de quantifier les dérivés métaboliques du tryptophane. Trois régimes alimentaires seront testés un régime LM, un régime PPN standard et un régime sans protéine. Les effectifs prévus sont de 36 mini-porcelets (n=12 animaux par régime alimentaire).

-La seconde étape consistera en l'étude de la biodisponibilité des acides aminés dans des PPN dont la composition protéique pourrait modifier la biodisponibilité en tryptophane. Trois PPN seront testés avec un effectif prévu de 36 mini- porcelets (n=12 animaux par PPN).

Le protocole a été élaboré dans le respect de la règle éthique des 3R (1) Remplacer le projet s'intéressant à des réponses physiologiques, l'utilisation d'un modèle animal vivant est indispensable. Le modèle animal choisi est le porcelet pour sa ressemblance d'un point de vue anatomique et physiologique avec le nouveau-né humain (2) Réduire les effectifs (n=12 par groupe soit un nombre total = 72) ont été fixés à minima pour permettre une évaluation statistiquement significative des effets attendus (réponses métaboliques) (3) Raffiner les compétences et expériences des expérimentateurs garantissent le respect du bien-être animal. Des points limites ont été établis, entraînant la sortie de protocole ou le sacrifice anticipé de l'animal si nécessaire.

14880 Notre projet propose d'étudier les effets de la relaxine-1 et de la relaxine 3 dans le contrôle de la transmission sensorielle normale et pathologique. Le rôle de la relaxine-1 n'est pas encore connu mais ce peptide est synthétisé dans des régions qui participent à la transmission sensorielle.

Pour sa part, la relaxine-3 est libérée dans plusieurs aires cérébrales où elle influence un grand nombre de fonctions comme la prise de nourriture, l'addiction à l'alcool, le sommeil, le stress L'interaction avec son récepteur RXFP3, contribue à limiter le stress induit par des conditions pathologiques ce qui en fait une molécule potentiellement efficace contre la douleur fréquemment associée à des situations de stress. Nous avons montré lors d'expériences préliminaires que la relaxine-3 injectée dans le cerveau avait des effets analgésiques significatifs en cas de douleurs inflammatoires. Nous allons maintenant nous attacher à préciser les aires cérébrales et les voies nerveuses qui sont affectées par la Relaxine-3.

Nous travaillerons d'abord sur des animaux contrôles puis sur des modèles inflammatoires chez la souris.

Nous étudierons alors les modifications des voies nerveuses impliquées régulées par la Relaxine-1 et de la Relaxine-3. A l'aide d'enregistrements électrophysiologiques, nous chercherons si l'injection intra-cérébrale de Relaxine-1 ou de Relaxine-3 produit un effet analgésique au niveau de la moelle épinière. Nous décrirons les voies nerveuses régulées par la relaxine-1 ou la relaxine-3 grâce à l'injection de marqueurs viraux dans le cerveau.

Ce projet respecte la règle des 3R. Pour le R de Raffiner, tous les protocoles sont optimisés pour soulager le stress et la douleur des animaux. La chirurgie sera réalisée sous anesthésie gazeuse comme indiqué lors des procédures et un antalgique sera administré quand c'est nécessaire avant et après chirurgie pour éviter les douleurs post-chirurgicales. Les animaux seront surveillés quotidiennement par l'expérimentateur avec une surveillance renforcée après la chirurgie jusqu'à la fin de l'expérimentation avec la mise en place d'une réhydratation, un réchauffement et des traitements vétérinaires si besoin. Des points limites sont définis pour éviter la souffrance des animaux. Pour le R de Remplacer, le recours au modèle animal est indispensable car ce projet demande une évaluation comportementale sur animal entier et aucun modèle *in vitro* ne peut répondre à cette étude.

La réduction du nombre d'animaux (R de réduire) est prise en compte tout en conservant une signification scientifique statistique qui tient compte de l'hétérogénéité inter-individuelle. Le nombre de souris utilisé dans chacun des groupes expérimentaux sera ainsi de 12 animaux par groupe. La réalisation de ce projet nécessite au total l'utilisation de 780 souris de type C57Bl/6J.

14881 Le lipopolysaccharide (LPS) est un composant essentiel de la paroi externe des bactéries Gram négatif qui provoque une infiltration de cellules immunitaires.

Le LPS, présent dans la paroi cellulaire bactérienne, est connu pour provoquer l'inflammation pulmonaire conduisant à une augmentation de la perméabilité vasculaire. Il a été rapporté que le LPS était à l'origine de ALI (Acute Lung Injury) par plusieurs mécanismes inflammatoires. Le LPS induit une libération accrue de cytokines inflammatoires.

Les flavonoïdes sont un groupe de substances naturelles connues pour leurs nombreuses propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes pouvant être utilisées comme traitement dans les ALI. Certains flavonoïdes ont déjà été indiqués pour leur rôle protecteur dans l'ALI mais aucune étude n'a encore montré sa fonction dans les lésions pulmonaires aiguës. C'est pourquoi l'étude de nouvelles molécules thérapeutiques est nécessaire.

L'animal utilisé est la souris C57BL/6 ou BALB/c. Ces modèles animaux sont des mammifères suffisamment proches de l'Homme. Nous partageons 95% de nos gènes avec la souris, ce qui en fait un modèle efficace pour la recherche.

Le LPS provoque chez la souris des lésions aiguës des poumons (ALI) et une inflammation caractérisée par un recrutement massif de neutrophiles dans les poumons.

L'administration de la LPS à l'animal se fait sous anesthésie générale afin de minimiser les situations douloureuses et stressantes. Ce modèle induit des douleurs inflammatoires aiguës à l'animal, liées au développement de la maladie pulmonaire se traduisant par des difficultés respiratoires et des yeux mi-clos et une prostration légère. Des points limites comprenant l'aspect et le comportement des animaux avec une grille de scores sont mis en place. Une surveillance quotidienne des animaux y compris les week-ends est effectuée pendant la période d'acclimatation, puis les animaux sont suivis et évalués en continu une fois le LPS administré. Les animaux sont mis à mort avant la fin de l'expérimentation s'ils présentent des signes de souffrance avec un score total supérieur ou égal à 3, comme un poil fortement hérissé, un dos voûté, une immobilité. Les souris sont hébergées par 5 dans des compartiments de 530 cm².

Le projet représente un ensemble d'études types. Le nombre d'études réalisées durant la période de validité de l'autorisation dépendra du nombre de molécules à tester. Le projet pourra comporter jusqu'à 20 études, incluant au maximum 90 animaux, soit 1800 animaux au total.

A ce jour, l'animal de laboratoire reste le seul recours fiable et pertinent permettant de tester des nouvelles molécules thérapeutiques ciblant la lésion pulmonaire aiguë (ALI). Ce projet sera réalisé en respectant les principes fondamentaux de l'expérimentation animale

-Remplacement le modèle animal est fondamental dans notre cas, puisque l'étude de l'inflammation et de la pathologie ne peut se faire que sur un organisme vivant entier.

-Raffinement Les animaux sont observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être et d'éviter au maximum leur douleur au moment de l'expérimentation. Des points limites sont mis en place et appliqués quotidiennement (scores comprenant l'aspect, le comportement et la prise alimentaire des animaux) afin de limiter la souffrance de l'animal. De plus afin de limiter la douleur, les animaux sont anesthésiés lors de l'administration de LPS.

-Réduction Le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats pertinents et reproductibles, évitant ainsi de refaire plusieurs fois les mêmes expérimentations.

14882 Les vitamines du groupe B en particulier les vitamines B9 et B12 jouent un rôle majeur dans la synthèse d'acides nucléiques (ADN/ARN) et des acides aminés (protéines) nécessaires à la croissance cellulaire, ce qui explique leur caractère indispensable au cours du développement. Ces micronutriments sont obtenus, principalement, à partir de légumes à feuilles (B9) et à partir des aliments d'origine animale (B12). La carence nutritionnelle ou due à une maladie acquise ou génétique, peut avoir des conséquences graves sur la santé. Ces conséquences sont plus graves si la carence se produit dans des étapes précoces de la vie. Des études précédentes sur des animaux présentant une déficience en vitamine B pendant la gestation et l'allaitement, ont montré un faible poids de naissance et une accumulation de graisses dans le foie et cœur. Ces vitamines sont nécessaires à la production de nouvelles cellules, ce qui les rend particulièrement importantes durant les périodes d'activité métabolique intense comme la grossesse (développement du fœtus),

l'enfance et l'adolescence. Des observations faites en 1986 ont montré que les individus nés avec un petit poids de naissance ont un taux de mortalité cardiovasculaire plus élevé une fois atteint l'âge adulte. Chez la femme, la carence alimentaire en vitamines B9 et B12 pendant la grossesse et l'allaitement est fréquente et induit chez le fœtus des effets de « programmation fœtale » associés aux pathologies chroniques liées à l'âge, notamment métaboliques, hépatiques, myocardiques et neurologiques. L'accumulation sanguine d'homocystéine, marqueur de la carence vitaminique, a été décrit comme un inducteur des pathologies cardiovasculaires. Cependant, les manifestations vasculaires et leurs mécanismes moléculaires liés à la programmation fœtale causée par cette carence n'ont pas été étudiés. Cette étude permettra l'analyse des fonctions cardiaques lors d'une carence et ainsi déterminer des biomarqueurs précoces afin de mettre en place des traitements préventifs aussi bien dans le cadre de la clinique humaine que vétérinaire.

Pour comprendre les mécanismes liant la carence maternelle à un défaut de la fonction aortique, des rates adultes seront soumises à un régime carencé en vitamines B9 et B12 un mois avant accouplement, et ce régime sera maintenu tout au long de la gestation et de l'allaitement. L'étude se déroulera en 4 phases antichronologiques afin de déterminer les fenêtres d'exposition critique. L'engagement d'une phase dépendra alors des résultats obtenus dans la phase précédente. 1ère phase Les rats âgés de 21 jours, âge du sevrage, et nés de mères carencées en vitamines B9 et B12, seront étudiés au niveau physiologique (mesure de la pression artérielle) puis mis à mort pour doser les marqueurs de la carence et mener une étude sur l'expression des molécules impliquées dans la fonction aortique (en particulier des fibres élastiques et de collagène, constituants dans la paroi vasculaire) dans ces conditions de carence. Phase 2 : Si des altérations fonctionnelles ou anatomiques sont observées à 21 jours, nous envisagerons de passer à une seconde étude plus précoce, utilisant une progéniture âgée de 14 jours et basées sur les mêmes approches que celles mentionnées en phase 1. Phase 3 : Si des altérations fonctionnelles ou anatomiques sont observées à 14 jours, nous envisagerons de passer à une troisième étude plus précoce, utilisant une progéniture âgée de 7 jours et basées sur les mêmes approches que celles mentionnées en phase 1. Phase 4 Si des altérations fonctionnelles ou anatomiques sont observées à 7 jours, nous envisagerons de passer à une quatrième étude plus précoce, utilisant une progéniture âgée de 24h et basées sur les mêmes approches que celles mentionnées en phase 1.

Le nombre d'animaux engagés dans ces expériences est évalué au nombre de 277 sur 5 ans, nous avons pensé ce protocole en suivant la règle des 3R 1. Remplacement Il n'existe aucune alternative d'approche *in vitro* car notre étude porte sur les effets transgénérationnels d'une carence vitaminique, et sur le développement et la physiologie de l'aorte descendante chez le rat âgé de 21 jours, et né de mère carencée en vitamines B9 et B12. 2. Réduction 90 rats adultes géniteurs (13 mâles reproducteurs utilisés pour l'ensemble des phases 1 à 4 et pour chaque phase 26 femelles dont 20 soumises au régime carencé) seront nécessaires à l'étude. Issus des accouplements et de la gestation, 40 rats âgés de 21 jours, dont 20 nés de mères soumises au régime carencé, ont été estimés pour obtenir des résultats statistiquement satisfaisants (le même nombre de rats âgés de 14, 7 jours ou 24 heures, seront nécessaires pour les phases 2 à 4, respectivement). Les mâles et les femelles seront étudiés dans le même temps. En raison de la petitesse des animaux et des approches biochimiques, moléculaires ou d'imagerie envisagées nécessitant une quantité certaine de matériels, nous constituerons des groupes d'étude à raison de 20 individus. Ces groupes seront eux-mêmes divisés en sous-groupe de 5 animaux en fonction des approches méthodologiques utilisées, permettant ainsi l'interprétation scientifique des résultats par des tests statistiques appropriés. 3. Raffinement Chaque protocole expérimental débutera par une période d'acclimatation de 2 semaines à nos locaux. Les animaux sont surveillés quotidiennement et mis en place. Le point limite est fixé à 20% de perte du poids corporel (chez les adultes) avec repérage des signes de mal-être définis au préalable par notre vétérinaire référent. En fin de protocole les animaux seront mis à mort et des prélèvements (sang aortes) seront effectués. D'autres tissus seront également prélevés et congelés pour d'autres projets scientifiques et pour l'enseignement. Dommage / avantage escompté Chez la progéniture née d'une mère carencée, aucun animal verra ses altérations réversées du fait qu'aucune molécule ne sera administrée et susceptible de corriger les altérations.

14883 Le protocole animal que nous souhaitons soumettre a pour but de mettre au point un modèle préclinique de lymphomagénèse mimant celle compliquant la maladie coeliaque (MC).

La MC est une maladie intestinale inflammatoire fréquente induite chez des sujets génétiquement prédisposés par l'ingestion de gluten. Chez ces sujets, le gluten est anormalement reconnu par le système immunitaire et son ingestion induit une réaction inflammatoire chronique, notamment dans l'intestin, à l'origine notamment de douleurs, de diarrhée et d'amaigrissement. Chez la très grande majorité des patients, l'éviction stricte et définitive du gluten alimentaire permet d'interrompre la réaction inflammatoire et de guérir les symptômes. Néanmoins, une complication rare mais très sévère est l'émergence de lymphomes intestinaux. Nous avons montré chez l'homme que ces lymphomes sont associés dans plus de 90 % des cas à des mutations qui favorisent la croissance des lymphocytes malins en présence d'un facteur soluble, l'interleukine 15, produit en excès dans l'intestin des patients. Ce résultat suggère que ces mutations sont responsables de l'émergence du lymphome dans l'intestin des patients coeliaques qui surproduisent l'interleukine 15. Nous souhaitons développer un modèle animal pour prouver cette hypothèse et disposer d'un modèle préclinique pour tester des stratégies thérapeutiques.

La première étape du projet sera de développer et optimiser un modèle préclinique murin récapitulant la lymphomagénèse compliquant la maladie coeliaque. Dans ce but, des souris irradiées ou non-irradiées recevront par voie intraveineuse des cellules de souris donneuses dans lesquelles nous aurons introduit ou non les mutations. Les souris receveuses seront soit des souris normales, soit des souris surexprimant l'interleukine 15 dans l'intestin pour mimer les conditions dans l'intestin des patients. La prise de greffe sera vérifiée par une prise de sang puis l'implantation des cellules sera suivie dans les différents organes, notamment l'intestin, pour démontrer l'apparition d'un lymphome. Une fois le modèle établi, nous testerons différentes thérapies. Celles-ci seront administrées aux animaux par injection intra-péritonéale et la réponse au traitement sera suivie en étudiant la diminution ou la disparition du lymphome. Dans un troisième temps, nous rechercherons le rôle de la réponse immune contre le gluten dans l'aggravation du lymphome. Des souris donneuses seront sensibilisées au gluten par injection sous-cutanée de gliadine (principale protéine du gluten) mélangée avec un adjuvant. Les cellules immunitaires seront ensuite isolées et injectées par la voie intraveineuse aux souris receveuses développant le lymphome. Les souris receveuses recevront une nourriture contenant du gluten. Nous testerons si l'injection de cellules sensibilisées accélère ou amplifie le développement du lymphome.

Pour respecter le principe des 3R,

- Remplacement Nous nous efforçons de développer des lignées cellulaires issues des patients pour tester les médicaments *in vitro* et de sélectionner uniquement les médicaments les plus efficaces *in vitro*, ce qui permettra de réduire fortement l'utilisation d'animaux. Cependant celles-ci ne nous permettent pas de tester le mécanisme d'initiation du lymphome. L'utilisation de modèles animaux reste donc indispensable à cette étude

- Réduction Le nombre d'animaux est évalué à 2252 souris sur 5 ans. Pour réduire le nombre d'animaux, nous avons estimé la taille des échantillons permettant une analyse statistique des résultats grâce aux données collectées au cours d'expériences précédentes et en tenant compte du minimum d'étapes nécessaires pour valider l'implication des différents facteurs dans le développement du lymphome.

- Raffinement Les expériences et en particulier l'injection de cellules seront réalisées par des personnes expérimentées et qualifiées afin d'éviter toutes fausses manipulations ou un éventuel stress pour les animaux. Les procédures d'injection sont peu douloureuses et ne justifient donc pas l'utilisation d'anti-inflammatoires ou analgésiques qui pourrait compliquer l'interprétation des résultats sur la progression tumorale. Les animaux seront particulièrement surveillés lors de ces procédures. Afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligées aux souris, les prélèvements de sang par la voie retro-orbitale se dérouleront sous anesthésie générale et seront effectués par du personnel expérimenté. Des points-limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire. De plus l'environnement des animaux est enrichi avec des maisonnettes en cartons, du coton de nidification, de bâtonnets à ronger et des cylindres.

Un objectif thérapeutique important est la mise au point de traitements capables d'éliminer les cellules clonales mutées avant leur transformation en lymphome agressif conduisant à un mauvais pronostic. Tous les patients ne répondent pas de la même façon aux immunothérapies, probablement au sein des différentes mutations trouvées, ce projet devrait permettre de mieux comprendre comment cibler spécifiquement ces cellules tumorales et ainsi, permettre une meilleure prise en charge des patients.

14884 L'objectif général du projet est de comprendre les systèmes qui permettent à l'organisme de moduler les commandes motrices en réponse à une information sensorielle. Une telle étude pourrait permettre d'identifier de potentielles cibles de traitement des maladies atteignant ces systèmes, comme la sclérose latérale amyotrophique, une maladie neurodégénérative pour laquelle il n'existe aujourd'hui aucun traitement efficace. Pour ce faire, nous nous intéressons à des populations de neurones présentes dans la moelle épinière, qui ont la particularité de moduler les influx nerveux à l'origine des mouvements ou de moduler les informations sensorielles perçues par l'organisme. Les expériences sont effectuées chez la souris, dont un modèle de sclérose latérale amyotrophique.

Nous travaillons sur la moelle épinière, d'une part car c'est là où se situent les neurones innervant les muscles (motoneurones), mais aussi, car c'est par là que les informations sensorielles transitent et sont intégrées avant d'être transmises au cerveau. Les neurones qui nous intéressent sont ceux qui contrôlent l'action des motoneurones grâce à une connexion directe et/ou des neurones qui reçoivent la commande motrice du cerveau. Des données suggèrent qu'au moins une partie de ces neurones reçoivent ou modulent des informations sensorielles.

Notre projet propose de déterminer de manière anatomique et fonctionnelle les informations reçues par ces neurones impliqués dans le circuit sensorimoteur, grâce à des expériences de traçage, à enregistrements électrophysiologiques *in vitro*, *in vivo* et des expériences de comportement. Au total, le projet utilisera au maximum 770 souris pour les cinq années du projet. La règle des 3R, qui vise à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés, en utilisant le nombre d'animaux minimum pour avoir des données statistiquement significatives

* raffiner les approches expérimentales en utilisant des conditions d'hébergement adaptées, avec enrichissement (matériel pour nidification, bâton à ronger) en utilisant des anesthésies adaptées en contrôlant de façon permanente le bien-être animal en établissant des points limites.

* remplacer, quand cela est possible, les approches *in vivo* par des approches *in vitro*

a été prise en compte dans l'élaboration des procédures.

Ces expériences seront effectuées sur des souris contrôles ou génétiquement modifiées.

Notre projet va permettre d'une part d'élucider une partie la microcircuiterie neuronale de la moelle épinière participant à l'intégration sensori-motrice, mais aussi d'apporter des nouvelles connaissances sur le rôle des populations neuronales qui sont fortement affectées lors de la sclérose latérale amyotrophique.

14885 L'inflammation est un ensemble de mécanismes réactionnels de défense par lesquels l'organisme reconnaît, détruit et élimine toutes les substances qui lui sont étrangères (agent infectieux, substance étrangère inerte, agent physique...). L'inflammation commence par une réaction de « reconnaissance » faisant intervenir différents types de cellules dont les lymphocytes T. Selon le type d'activation lymphocytaire et donc de cytokines sécrétées, l'inflammation met en jeu l'immunité cellulaire ou au contraire la sécrétion d'anticorps. L'immunité cellulaire est induite par une réponse lymphocytaires de type Th1 (IL-2, IFN- γ , IL-12). La sécrétion d'anticorps est induite par une réponse Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 ou IL-13). Enfin, les réactions auto-immunes sont induites par une réponse Th17 (IL-17A). La complexité des mécanismes de la réaction inflammatoire empêche la description d'un schéma d'ensemble et oblige à une description analytique et individuelle des cellules et des médiateurs qui la composent.

La phase préclinique qui consiste à l'étude de l'action des agents pharmacologiques *in vivo* chez le rongeur est une étape essentielle dans le développement de médicaments. Ce projet a pour but de tester de nouveaux médicaments anti-inflammatoires. Les animaux vont recevoir une dose de 5

µg/souris d'anti-CD3ε par voie intraveineuse (100 µL/souris) afin d'induire une réaction inflammatoire en chaîne conduisant à une réponse immunitaire à la fois Th1, Th2 et Th17. L'activation cellulaire va conduire à une production massive de cytokines, appelée « cytokines storm », responsable de l'inflammation. Les animaux seront ensuite mis à mort au bout de 2h afin d'analyser différents paramètres immunologiques. Ceci permettra d'étudier l'effet anti-inflammatoire des molécules testées et de déterminer leur cible d'action.

L'animal utilisé est la souris C57BL/6. L'administration de l'anti-CD3ε à l'animal se fait par voie intraveineuse sans anesthésie (pas de douleur autre que celle de l'aiguille). Ce modèle induit une réaction inflammatoire aiguë, liée au développement de la maladie (Les signes cliniques liés au développement de la maladie tel que la production de cytokines ne sont pas observables à l'œil). Une surveillance quotidienne des animaux y compris les week-ends est effectuée pendant la période d'acclimatation et d'expérimentation. Des points limites adaptés et prédictifs, tels que l'aspect et le comportement, sont mis en place permettant de limiter la souffrance de l'animal. Les conditions d'hébergement sont celles qui sont requises par l'annexe II de l'arrêté relatif à l'agrément des EU. Les animaux seront mis à mort selon la réglementation en vigueur.

Le projet représente un ensemble d'études types. Le nombre d'études réalisées durant la période de validité de l'autorisation dépendra du nombre de molécules à tester. Le projet pourra comporter jusqu'à 20 études, incluant au maximum 90 animaux, soit 1800 animaux au total.

A ce jour, l'animal de laboratoire reste le seul recours fiable et pertinent permettant de tester des nouvelles molécules thérapeutiques anti-inflammatoires. Ce projet sera réalisé en respectant les principes fondamentaux de l'expérimentation animale

-Remplacement le modèle animal est fondamental dans notre cas, puisque l'étude de l'inflammation et de la pathologie ne peut se faire que sur un organisme vivant entier.

-Raffinement Les animaux sont observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être et d'éviter au maximum leur douleur au moment de l'expérimentation. Au cours de chaque étude, un suivi quotidien des animaux (week-end inclus) est réalisé, les animaux présentant des signes de souffrance à hauteur des points limites présentés en 3.4.13 seront mis à mort.

-Réduction Le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats pertinents et reproductibles, évitant ainsi de refaire plusieurs fois les mêmes expérimentations.

14886 Les troubles du spectre autistique (TSA) sont d'origine multigénique et multifactorielle provoquant des troubles du comportement et de l'attention. A ce jour, des centaines de gènes susceptibles d'être impliqués dans l'autisme ont été identifiées. Ces gènes n'expliquent pourtant que 10 à 20 % des cas de TSA.

A l'aide de cellules souches de patients autistes, nous avons récemment identifié le gène MOCOS (MOlybdène COfacteur Sulfurase) comme un gène associé à l'autisme. Ce gène code pour une enzyme sous-exprimée dans 80% des échantillons de notre cohorte. L'identification du gène MOCOS est surprenante car notre cohorte de patients autistes présente des phénotypes comportementaux et cognitifs très divers. Cela nous conduit à penser que MOCOS joue un rôle crucial dans la physiopathologie des TSA et pourrait constituer un biomarqueur des troubles autistiques.

Il est très difficile d'obtenir des prélèvements biologiques de patients autistiques. Il existe plusieurs modèles de souris « autistes » présentant des troubles du comportement. Néanmoins, aucun de ces modèles ne reflète la complexité du syndrome autistique.

Le gène Mocos est présent dans de très nombreux organes chez les vertébrés et l'absence de son expression pourrait rendre compte non seulement du syndrome autistique mais également de plusieurs des co-morbidités fréquemment observées chez les patients autistes. Les comorbidités sont des pathologies secondaires souvent liées à l'autisme. Elles regroupent les troubles du comportement (troubles du sommeil, sensoriels, de l'alimentation) mais également des troubles métaboliques, gastrointestinaux ou encore des troubles du système immunitaire.

Notre objectif a donc été de créer un modèle de souris plus représentatif du syndrome autistique en générant des souris déficientes pour le gène Mocos. Deux types de souris ont été nouvellement créés et n'ont pas encore été totalement caractérisés des souris entièrement déficientes dans l'expression du gène Mocos (Mocos KO) et des souris avec un allèle conditionnel permettant une délétion spécifique du gène Mocos dans certains tissus (cKO). Ces animaux seront étudiés au niveau anatomo-pathologique, biochimique/métabolique et comportemental. Les animaux MOCOS hétérozygote, qui ne présentent pas de phénotype dommageable, seront accouplés ensembles pour permettre la production de souris KO. Les souris KO homozygotes ont un phénotype dommageable mais les souris hétérozygotes ne présentent pas de phénotype dommageable.

Analyse anatomo-pathologique Les premières observations des souris Mocos KO indiquent qu'une insuffisance rénale grave conduit à une létalité vers 4 à 5 semaines alors que les animaux Mocos hétérozygotes (exprimant seulement 50% du gène Mocos) sont parfaitement viables. Les problèmes rénaux des animaux Mocos KO seront donc analysés précocement vers 3 à 4 semaines afin de réduire le plus possible toute douleur ou souffrance durable que pourrait ressentir les animaux. Les souris seront mises à mort avant l'atteinte du point limite.

Lors de l'analyse rénale, les cerveaux des souris Mocos KO seront également récupérés afin de compléter leur étude par l'observation de l'imagerie cérébrale et de déterminer si des perturbations déjà décrites chez des patients autistes sont aussi visibles dans notre modèle de souris.

Les analyses anatomo-pathologiques seront également réalisées sur les animaux Mocos hétérozygotes et les animaux Mocos cKO dans lesquels le gène Mocos est absent uniquement dans certaines cellules. Aucune de ces lignées avec une délétion partielle du gène mocos ne présente de phénotype dommageable. Seuls les animaux avec une absence totale de mocos (MOCOS KO) dans toutes les cellules de l'organisme présentent un phénotype dommageable. Différents organes [reins, cerveau, foie, intestin, les fluides (sang, urine) et fèces] seront récoltés et analysés à l'âge de 2 mois. Pour suivre l'apparition éventuelle de pathologies plus discrètes et plus tardives, nous effectuerons des analyses bimestrielles sur les animaux Mocos hétérozygotes (ou plus fréquemment suivant les observations) jusqu'à l'âge de 20 mois.

Stress inflammatoire L'étude permet l'exploration des perturbations éventuelles qui peuvent se développer chez les souris Mocos KO. Nos analyses porteront plus particulièrement sur la recherche de phénotypes autistiques mais également sur l'analyse de phénotypes associés à l'autisme tels que l'inflammation à bas grade et désordres gastro-intestinaux. En raison de leur mort prématurée, ces animaux ne pourront pas être étudiés sur le plan comportemental. Les syndromes autistiques et co-morbidités pourront néanmoins être analysés sur les souris Mocos hétérozygotes et les cKO. Ces études seront réalisées sur les souris âgées de 2 mois. L'induction d'un stress pourra nous permettre d'identifier les mécanismes biologiques mis en jeu.

A ce jour, l'animal de laboratoire reste le seul recours fiable et pertinent permettant d'étudier les mécanismes complexes et les interactions gène/environnement entrant probablement en jeu dans les TSA, Ces objectifs peuvent difficilement être atteints *in vitro* ou *in silico*. Ce projet sera réalisé en respectant les principes fondamentaux de l'expérimentation animale ainsi que la règle des 3R :

Remplacement le modèle animal est fondamental dans notre cas, puisque l'étude de la physiopathologie complexe de l'autisme ne peut se faire que sur un organisme vivant entier. Nous avons néanmoins commencé la mise en culture de cellules primaires (Fibroblastes) comme source alternative de matériel biologique. Mais il n'est pas certain que cette approche soit utile pour permettre l'économie d'animaux.

Raffinement chaque procédure sera suivie quotidiennement pour s'assurer du bien-être des animaux et éviter au maximum la douleur au moment de l'expérimentation. Si des animaux montrent des signes de souffrance (point limite : score au point limite (décrit en paragraphe 3.4.13 et dans chaque procédure), ils seront mis à mort.

Réduction le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement pertinents et reproductibles, évitant ainsi de refaire plusieurs fois les mêmes expérimentations.

L'ensemble du projet nécessite l'utilisation d'environ 1137 souris sur 5 ans.

14887 CONTEXTE : Le cancer de la prostate est actuellement le deuxième cancer le plus fréquemment diagnostiqué chez l'homme (1.3 million de nouveaux cas en 2018 dans le monde). Cependant, grâce à l'amélioration des méthodes de dépistages et de prises en charge, il n'occupe que la cinquième place en termes de mortalité. Malgré un taux de survie augmenté, les effets secondaires des traitements (incontinence urinaire, impuissance, inflammation du rectum.) restent une préoccupation majeure.

Depuis près de 20 ans, une des diverses techniques indiquées pour détruire ce cancer est le traitement par ultrasons focalisés de haute intensité (HIFU High Intensity Focused Ultrasound). Cet outil thérapeutique, mini-invasif et non-ionisant, a pour avantage de diminuer les risques post-opératoires et les effets secondaires. Si aujourd'hui les outils diagnostiques s'orientent vers une détection précoce de tumeurs de petite taille, la précision des traitements HIFU est actuellement insuffisante pour permettre une destruction localisée de ces foyers cancéreux en particulier au plus proche de zones sensibles comme l'urètre par exemple.

OBJECTIF : Sur la base de modélisations numériques, une nouvelle stratégie de traitement a donc été développée. Elle vise à créer dans la prostate des lésions homogènes aux contours précis n'incluant que la zone cancéreuse définie par le praticien et épargnant plus sûrement les zones sensibles dont la destruction est à l'origine d'effets secondaires.

L'objectif de ce projet est de tester et valider *in vivo* cette nouvelle stratégie de traitement sur un modèle porcin, plus précisément

- L'objectif premier est de vérifier la sécurité du traitement, c'est-à-dire de vérifier que le rectum et les organes environnant ne sont pas touchés,
- Secondairement, l'effet de la perfusion pourra être déterminé en comparant les zones traitées sur animal vivant et mort (avant et après mise à mort),
- l'amélioration de la précision du traitement (contour de la lésion) sera évaluée par comparaison avec la stratégie actuellement appliquée en clinique.

La prostate du porc étant petite et difficilement accessible et la voie de traitement chez l'humain étant la voie rectale, le modèle utilisé est le suivant une ouverture de l'abdomen sera réalisée et une incision dans le caecum sera pratiquée afin d'y introduire la sonde de traitement. La sonde sera ensuite amenée au contact du foie qui possède des propriétés acoustiques et une réponse thermique proches de celle de la prostate. Des lésions dont la position et la géométrie seront précisément déterminées seront réalisées sur le foie de l'animal. En termes de positionnement, la conformité des lésions obtenues sera évaluée à l'aide de repères (ressorts...) préalablement injectés dans le foie. En termes de géométrie, la conformité sera évaluée par la mesure a posteriori de la lésion sur le foie prélevé et imagé par IRM.

TYPE DE PROJET/PROCEDURES/ESPECE ANIMALE/SORT DE L'ANIMAL

Ce projet de recherche translationnelle sera composé d'une procédure sans réveil et mettra en œuvre 12 porcs. Chaque porc sera anesthésié, sous assistance respiratoire et monitoré. Un traitement analgésique sera administré tout au long de la procédure. Cette approche peropératoire permettra de réaliser jusqu'à 4 traitements sur le foie d'un même animal pour une durée d'anesthésie de 4 heures maximum. Chaque zone traitée sera de l'ordre de 3-4cm³. Au terme de la procédure, l'animal sera euthanasié et le foie prélevé.

CONFORMITE AVEC LES 3R

Remplacement un des objectifs étant l'étude de l'influence de la perfusion sur le traitement, il n'est pas possible de se passer d'une expérimentation in-vivo. Une modélisation informatique a été utilisée au préalable pour concevoir le protocole ce qui a permis de repousser l'expérimentation animale jusqu'au stade où elle devient inévitable.

Réduction Au moins un premier essai sera effectué sur un animal mis à mort au terme d'un autre projet. Dès que cela sera possible, trois ou quatre lésions (dont une ou deux post-mortem) seront effectuées par animal, ce qui permettra de réduire le nombre d'animaux utilisés (un troisième traitement possible sur un animal réduit de 1 le nombre d'inclusions nécessaire cf. §3.3.5).

Raffinement Pendant l'anesthésie, l'animal recevra un traitement antidouleur. La procédure sera effectuée par un chirurgien expérimenté. Après la mise à mort, les organes, hormis le foie, seront proposés à un réseau de chercheurs.

14888 Les modèles murins génétiquement modifiés sont indispensables pour l'étude de

- la régulation et fonction de gènes,
- rôle d'un gène dans la formation de tumeur
- l'obtention de modèles pouvant être utilisés pour des tests thérapeutiques

Après une première étape d'analyse *in vitro*, le recours à la souris génétiquement modifiée permet de comprendre les mécanismes sous-jacents au niveau d'un organisme entier. Notre projet consiste à développer de nouvelles lignées murines pour permettre aux chercheurs d'avoir les outils les plus adaptés à leurs études. Bien évidemment, les lignées ne sont créées que si elles présentent un intérêt biologique potentiel et si elles n'existent pas par ailleurs dans d'autres établissements de recherche. Notre expertise nous permet d'avoir d'excellents résultats et donc de minimiser le nombre d'animaux nécessaires.

Nous prévoyons d'utiliser 2394 souris pour les 2 prochaines années.

Dans un souci de raffinement, toutes les mesures seront prises pour éviter le stress et la douleur des animaux. Ainsi, les gestes techniques sont assurés par du personnel qualifié, avec un recours à l'anesthésie et l'analgésie lors des procédures chirurgicales.

14889 Les animaux génétiquement modifiés sont des outils précieux pour la recherche scientifique sur l'animal. Des mammifères génétiquement modifiés ont déjà été créés dans de nombreux laboratoires de recherche. Beaucoup de ces animaux -essentiellement des souris, poissons et drosophiles- sont mis à la disposition des chercheurs après demande auprès des organismes chargés de la conservation de ces lignées. Cependant, ces modèles ne sont pas pertinents pour toutes les études. Ainsi, malgré ces ressources, il est nécessaire de créer de nouveaux organismes génétiquement modifiés en réponse à des questions scientifiques nouvelles.

Aucun modèle "*in vitro*" ne peut remplacer les animaux pour ces études. En effet, il s'agit de mettre en évidence le rôle des gènes et d'analyser la différenciation cellulaire au sein d'organismes soumis à des changements permanents (par exemple le développement, la croissance, le vieillissement, les interactions avec l'environnement), organismes trop complexes pour pouvoir être modélisés par des systèmes "*in vitro*" ou "*in silico*".

La présente DAP concerne la production de lapins génétiquement modifiés. Cette production nécessitera l'utilisation de 4500 animaux. Elle consiste à obtenir des embryons par superovulation et saillie de femelles dites "donneuses". Les embryons reçoivent par injection de l'ARN, de l'ADN, des protéines ou autres agents qui vont provoquer une mutation; ils sont ensuite transférés dans les voies génitales d'une lapine dite "receveuse" traitée hormonalement pour développer une gestation. Après la naissance, le génotype des petits est analysé (prélèvement de peau d'oreille par clip, puis analyse de l'ADN dans les deux semaines après la naissance). Les animaux génétiquement modifiés obtenus (=fondateurs, encore nommés F0) sont élevés jusqu'à l'âge adulte, puis croisés chacun avec un animal normal de l'animalerie. Le génotype des animaux F1 nés de ces saillies est déterminé de la même façon que celui des F0. L'analyse expérimentale de ces animaux F1 ne fait pas partie de la présente DAP.

Nous avons mis en oeuvre des stratégies pour utiliser le plus petit nombre possible d'animaux

1- obtention du plus grand nombre d'embryons par femelle donneuse, en soumettant ces femelles à un traitement de superovulation (injections hormonales répétées). Puisque la récupération des embryons chez le lapin ne peut se faire qu'après abattage de la femelle donneuse, l'utilisation de femelles soumises à un traitement de superovulation permet d'obtenir un grand nombre d'embryons et ainsi de réduire le nombre de femelles abattues;

2- test "*in vitro*" de l'efficacité des traitements des embryons après manipulation, les embryons sont conservés en vie pendant quelques jours dans un milieu nutritif puis analysés pour déterminer le

taux de survie et le nombre d'embryons mutants. Seuls les injections ou autres traitements permettant d'obtenir la mutation désirée sont ensuite utilisés;

3- pour chaque mutation désirée, utilisation des animaux par lots avec des effectifs de petite taille, regroupement des expérimentations et analyse dès que possible de l'issue (réussite ou échec) des manipulations. Détection des gestations par échographie; cet examen, non traumatisant, sans chirurgie ni anesthésie, permet de savoir si une femelle est gestante une semaine après le transfert, de connaître approximativement le nombre de foetus et d'estimer si une naissance est vraisemblable. Tout ceci permet une meilleure programmation des expérimentations, éventuellement de supprimer des expérimentations qui ne seraient pas utiles.

4- pour chaque mutation désirée, dès que 3 lapereaux génétiquement modifiés sont obtenus (3 fondateurs), la récolte d'embryons, et le transfert après injection ne sont plus réalisés.

5- Une veille scientifique permanente est assurée pour améliorer toutes ces techniques et utiliser celles qui sont les plus efficaces.

Toutes les précautions sont prises pour gérer de façon optimale les douleurs éventuellement engendrées :

-- pour chaque mutation désirée, avant le démarrage des expérimentations, il est nécessaire d'obtenir le maximum de renseignements dans la littérature scientifique spécialisée concernant les effets attendus et possibles. La production d'animaux portant des mutations entraînant des douleurs ne fait pas partie de la DAP. Cependant, si des douleurs induites par la mutation sont constatées chez la mère pendant la gestation ou chez le nouveau-né après la naissance, des mesures seront mises en oeuvre pour les réduire. Si ces mesures sont inefficaces, la production d'animaux portant cette mutation n'est pas poursuivie.

-- surveillance des animaux dans l'élevage pour détecter les signes d'altération de la santé.

-- raffinement des procédures opératoires autant que possible (anesthésie, analgésie, soins post-opératoires).

-- demande d'intervention auprès des vétérinaires présents sur le centre (dans l'unité, au sein de l'unité élevage du centre) ou le vétérinaire sanitaire responsable de l'élevage. Les recommandations du vétérinaire sont alors suivies pour soigner l'animal ou supprimer la douleur. Si les soins n'apportent aucun résultat positif, l'animal est euthanasié.

-- dans le cas de femelles en gestation, si la mise bas n'a pas eu lieu à la date théorique, une détection de la présence des foetus et de leur vitalité peut être faite (échographie, palpation). Sur avis du vétérinaire, une induction hormonale de la mise bas ou une césarienne peuvent être pratiquées et les petits adoptés par une femelle de l'élevage au cas où la mère ne serait pas capable d'allaiter ses petits.

Des précautions comportementales sont mises en place les animaux sont élevés individuellement (1 animal par cage) après leur sevrage. Les cages sont grillagées ce qui permet aux animaux d'avoir des contacts visuels. Chaque cage est agrémentée d'une mezzanine pour permettre à l'animal de se déplacer dans un plus grand espace. Des enrichissements sont proposés aux animaux (balles type ping-pong). L'environnement (bruit, odeurs, lumière, température, hygrométrie) est contrôlé au cours du temps.

14890 La communauté scientifique utilise le rat comme modèle animal pour faire progresser la recherche biologique et médicale.

Notre laboratoire propose différentes prestations permettant la conservation et la décontamination (rederivation) de lignées de rats.

Ces précieux modèles correspondent à des lignées génétiquement modifiées qui ne sont pas disponibles dans les établissements fournisseurs d'animaux de laboratoire.

La conservation des lignées se fait sous forme d'embryons congelés dans l'azote liquide à -196°C elle permet de redémarrer à tout moment un élevage si besoin et de bénéficier de modèles animaux déjà existants pour l'ensemble de la communauté scientifique.

Par année, nous pensons effectuer au maximum 30 prestations de congélations d'embryons ce qui correspond à l'utilisation de 1770 animaux.

Le service propose également une prestation de décontamination/redéivation de lignées rat transgéniques et/ou mutantes afin d'obtenir des animaux à statut sanitaire EOPS (Exempt d'Organismes Pathogènes Spécifiques).

Nous estimons utiliser au total 280 rats soit 20 lignées décontaminées maximum par an.

La règle des 3R est mise en application pour ce projet

-Réduire = -éviter le maintien inutile sous forme respirantes des lignées quand le chercheur a fini son étude grâce à la cryopreservation d'embryons

-Raffiner = - l'utilisation d'animaux ayant un statut sanitaire contrôlé évite les interactions scientifiques.

-tout les animaux utilisés pour ce projet ont un enrichissement de milieux afin d'améliorer leurs conditions d'hebergements.

-toutes les micros-chirurgies lié à ce projet sont réalisés sous anesthésie générale avec ajout d'analgésique si besoin.

-nous disposons de points limites adaptés et predictifs pour le suivie quotidiens des rats utilisés pour ce projet.

-Remplacer= au lieu d'utiliser des femelles sentinelles conçu uniquement pour la réalisation des contrôles sanitaire, nous remplaçons ses dernières par les mères porteuses dès le sevrage de leurs petits elles sont sorties de l'isolateur pour effectuer un contrôle sanitaire.

Pour les 2 types de prestations (= 50 prestations au total) nous utilisons par an au maximum

-2000 femelles donneuses (femelles porteuses d'une ou plusieurs modifications génétiques fournit par le chercheur ou des femelles spragues dawley ou long evens fournit par un laboratoire (le choix de la lignée est définit par le chercheur en fonction du fond genetique de sa lignée) mis en accouplement avec les mâles donneurs.

-250 mâles donneurs (mâles porteurs d'une ou plusieurs modifications génétiques fournit par le chercheur et mis en accouplement) : ses mâles ne subissent aucune experimentations; ils sont juste mis en accouplement; ils ne sont donc pas comptabilisés dans le nombre d'animaux utilisé pour ce projet.

- 10 mâles vasectomisés (vasectomie=Section chirurgicale des canaux déférents permettant la stérilisation tout en maintenant la fonction érectile du pénis) par an pour la production des femelles pseudos gestantes (les femelles pseudos-gestantes seront ensuite réimplantées avec des embryons soit pour réaliser un test de viabilité (vérifier la capacité d'un embryons congelés à se régénérer in-vivo) dans le cas d'une prestation de cryoconservation ou pour obtenir des petits pour une prestation de décontamination/rederivation.

- 140 femelles « nourrices » (femelles pseudogestantes) qui porterons les embryons reimplantés.

Pour l'ensemble des 50 prestations qui sera effectuées par le service cryoconservation/décontamination, nous estimons la quantité totale d'animaux utilisés pour 5 ans à 8850 rats maximum soit 1770 rats par an.

Les douleurs engendrées aux animaux sont soit l'injection d'hormones en mode intra-péritonéale (à raison de 2 injections à 48h d'intervalle), soit l'injection d'anesthésique en mode intra-péritonéale de façon à réaliser la réimplantation d'embryons et la vasectomie qui sont des opérations chirurgicales de courte durée.

Les avantages de la cryoconservation et /ou décontamination de lignées rats est de permettre de conserver et/ou de fournir à tous les utilisateurs un modèle rat avec des conditions sanitaires idéales pour mener à bien les études.

14891 Le syndrome d'apnées du sommeil (SAS) est le trouble respiratoire nocturne le plus fréquent dans la population. Il est associé à de nombreuses autres pathologies, parmi lesquelles les pathologies

cardiovasculaires comme l'infarctus du myocarde. Il touche 5 à 20% de la population et est un facteur de risque indépendant de la survenue d'événements cardiovasculaires fatals et non fatals.

Si le traitement actuel de référence du SAS semble fonctionner lorsqu'il est bien toléré, il apparaît essentiel de comprendre les mécanismes à l'origine de ces pathologies associées dans le but de proposer des compléments ou des alternatives thérapeutiques à ce traitement.

Le SAS est caractérisé par plusieurs conséquences dont l'hypoxie intermittente (HI) chronique, connue pour avoir le plus fort impact en termes de conséquences délétères cardiovasculaires. Ainsi, nous nous intéressons aux complications cardiovasculaires du SAS induites par l'HI chronique lors de l'ischémie-reperfusion (IR) myocardique, une technique mimant l'infarctus du myocarde chez l'Homme, dans le but d'élaborer des thérapeutiques ciblées alternatives ou complémentaires au traitement actuel.

Une récente étude vient de montrer qu'une molécule anti-diabétique (déjà mise sur le marché) serait bénéfique contre les lésions induites par l'IR de façon spécifique aux animaux « SAS ». En revanche, nous devons absolument comprendre le mécanisme d'action de cette molécule avant de la proposer comme traitement de choix à des patients apnéiques. L'une des cibles majeures de cette molécule est une protéine impliquée dans le traitement des sucres. Ainsi, nous devons vérifier, en utilisant des souris dont le gène codant pour cette protéine a été aboli, que si cette protéine est absente, notre molécule ne peut plus être bénéfique. C'est la raison de ce projet. Sinon nous devons trouver et démontrer d'autres raisons pour lesquelles notre molécule est efficace.

Ce projet nécessitera 176 souris, témoins et transgéniques dont les caractéristiques correspondent à nos besoins. Il mettra en oeuvre des modèles expérimentaux *in vivo* et *in vitro*. Nous exposerons les animaux à la normoxie ou à l'HI et les traiterons chaque jour avec cet anti-diabétique. A l'issue de l'exposition, les animaux seront, soit soumis à une IR cardiaque sous anesthésie générale pour étudier l'effet protecteur de cette drogue, soit mis à mort pour étudier les mécanismes induits par cette drogue et le rôle de notre protéine d'intérêt.

L'utilisation d'un modèle murin est encouragée par nos travaux précédents dans lesquels nous avons reproduit les conséquences délétères du SAS et parce que la souris nous permet de tester nos hypothèses à l'aide d'absence d'expression de certains gènes (animaux transgéniques). Tous les échantillons seront conservés de façon optimale dans le but de pérenniser notre matériel de travail.

Nous avons veillé à respecter au maximum la règle des 3R. Nous ne pouvons pas « remplacer » ce modèle animal par un autre modèle cellulaire puisqu'il n'existe aucune méthode alternative à l'expérimentation animale nous permettant de comprendre l'effet de l'HI chronique sur les organes et l'organisme entier. En revanche, suite aux travaux antérieurs de notre laboratoire nous avons « réduit » au maximum le nombre d'effectif par groupe pour observer des éventuelles différences significatives. Nous réaliserons des tests statistiques adaptés aux paramètres à évaluer. Enfin le « raffinement » consiste en un hébergement selon les règles de bien-être des animaux dans une animalerie adaptée et autorisée. Les animaux ne seront jamais manipulés dès leur arrivée dans l'animalerie mais uniquement après une semaine de stabulation. Les animaux seront observés quotidiennement dans leur cage pendant toute la durée de l'hébergement et du protocole d'hypoxie, et pesés au moins une fois par semaine, pour s'assurer de leur bien-être et de leur état de santé. L'eau et la nourriture seront à volonté et des enrichissements seront à leur disposition dans les cages.

D'un point de vue scientifique, ce travail permettra d'une part de mieux comprendre la physiopathologie du SAS dans le cadre de l'infarctus du myocarde, et d'autre part, de proposer de nouvelles cibles thérapeutiques aux patients apnéiques à risque cardiovasculaire élevé.

14892 Notre équipe s'intéresse aux mécanismes de codage des odeurs et aux processus de plasticité ayant lieu dans le système olfactif. Notre but est de comprendre comment le système olfactif détecte et discrimine les nombreuses odeurs de l'environnement, et d'évaluer l'influence des conditions environnementales ou physiologiques sur le système olfactif. Nous focalisons nos études sur le fonctionnement de l'épithélium olfactif qui est impliqué dans la première étape de la perception

olfactive. Cet épithélium contient des neurones responsables de la détection des molécules odorantes. Ils transforment l'information chimique en information électrique et la transmettent ensuite au cerveau.

Chez les mammifères, les molécules odorantes sont perçues la plupart du temps en mélange. Ces mélanges peuvent induire différents types de perception par exemple, le mélange a une odeur différente de celles de ses composants (on parle d'accord aromatique) ou bien l'odeur d'un composant masque l'odeur des autres constituants du mélange. A ce jour, on ne connaît pas les processus biologiques qui régissent ces différents modes de perception. L'une des principales hypothèses est que l'odeur des mélanges pourrait résulter d'évènements se produisant au niveau des récepteurs olfactifs localisés dans les neurones olfactifs. Il est établi qu'une molécule odorante peut interagir avec un nombre variable de récepteurs mais les mécanismes restent méconnus dans le cas d'un mélange de molécules.

Le présent projet a pour objectif d'identifier les récepteurs cibles de deux mélanges formant un accord aromatique et de deux mélanges donnant lieu à un phénomène de masquage.

L'approche que nous allons mettre en œuvre consistera à exposer des souris C57Bl6 âgées de 8 semaines à ces différents mélanges ainsi qu'aux molécules constituant ces mélanges, puis à analyser l'expression génique des récepteurs olfactifs avec une technique de séquençage d'ARNm à haut débit (technique de RNA-Seq). En effet, des études antérieures ont montré que les odorants modulent l'expression des récepteurs olfactifs avec lesquels ils interagissent. Cette approche va permettre de comparer le profil des récepteurs cibles des mélanges à celui de molécules isolées. Les résultats obtenus devraient apporter de nouvelles connaissances sur les phénomènes périphériques impliqués dans la perception des mélanges.

Au total, cette étude nécessitera l'utilisation de 216 souris.

La mise en œuvre du projet s'inscrit dans la règle des 3R.

Réduire : Pour concevoir ce projet, nous nous sommes appuyés sur des études ayant mis en œuvre la technique de RNA-Seq pour analyser le transcriptome d'épithéliums olfactifs de souris. Nous nous sommes également documentés sur la variabilité des mesures effectuées par cette technique et nous avons pris en compte le fait que ces analyses nécessitent de disposer d'extraits d'ARN non dégradés. L'ensemble de ces informations nous a permis de définir le nombre de groupes expérimentaux et de réduire au minimum le nombre d'animaux dans les groupes. Dans chaque groupe, le nombre d'animaux retenu est le nombre permettant d'analyser de façon fiable le transcriptome d'épithélium olfactif, compte-tenu de la variabilité généralement observée dans ce type d'analyses.

Raffiner : Ce projet sera réalisé dans des conditions permettant de limiter la souffrance et le stress des animaux. D'après les données disponibles dans la littérature, le protocole expérimental qui va être mis en œuvre ne devrait pas induire l'apparition de signes cliniques délétères. Toutefois, tout au long de l'étude, les conditions d'hébergement des souris feront l'objet d'une surveillance quotidienne et les animaux seront soumis à examen clinique hebdomadaire individuel. Tout animal présentant une perte de poids de plus de 10% et/ou une absence d'activité (interaction sociale, exploration, fabrication de nid) sera particulièrement surveillé. Si la perte de poids dépasse 20% et/ou si d'autres signes cliniques (prostration, efflanqué, inactivité) sont observés, les souris seront mises à mort pour des raisons d'éthique. A cette fin, un mélange d'anesthésiques adapté à cette espèce sera administré aux animaux juste avant la mise à mort. Cette procédure sera également mise en œuvre pour la mise à mort des animaux à l'issue du protocole expérimental.

Remplacement : L'épithélium olfactif est un organe complexe composé de structures neuronales et non neuronales associées à des éléments du système vasculaire. Le fonctionnement coordonné de toutes ces structures assure la détection et le transfert des signaux olfactifs vers le cerveau. A ce jour, il n'existe pas de modèles cellulaires permettant de reproduire de manière fiable le fonctionnement de l'épithélium olfactif. Seule une étude chez l'animal peut permettre d'étudier l'impact d'une exposition odorante sur le fonctionnement de l'épithélium olfactif.

14893 Dans le cerveau, l'information est transmise de neurones en neurones au niveau d'une structure spécialisée, la synapse. Afin que cette transmission ait lieu de manière efficace et adaptée, il est important de considérer le rôle d'une autre cellule, l'astrocyte. En effet, cette cellule, est capable de détecter les neurotransmetteurs libérés, via des récepteurs, et en retour de réguler l'efficacité avec laquelle les neurones communiquent au niveau des synapses via la libération de substances actives, appelées gliotransmetteurs.

Chez le rat juvénile, et plus spécifiquement dans l'hippocampe, une structure impliquée dans la mémoire, l'astrocyte est capable de détecter l'information synaptique via des récepteurs au glutamate. En retour, l'astrocyte libère des gliotransmetteurs appelés purines, afin de réguler positivement l'efficacité avec laquelle les neurones communiquent. Le but de ce projet est d'identifier si cette régulation est toujours présente à l'âge adulte afin de mieux comprendre comment l'information est transmise dans l'hippocampe. Pour se faire, plusieurs semaines après avoir modifié l'expression des récepteurs glutamatergiques astrocytaires, via l'injection d'une molécule spécifique dans l'hippocampe, nous réaliserons une étude électrophysiologique afin d'étudier l'impact de la diminution de la présence de ces récepteurs sur l'activité électrique des neurones et donc la transmission et la plasticité synaptique à long terme.

L'ensemble de ce projet nécessite l'utilisation de 624 rats males Wistar. Il n'existe actuellement pas de modèle *in vitro* et donc de méthode alternative permettant de REMPLACER les animaux. Afin de respecter la règle des 3R, nous avons REDUIT à 624 le nombre d'animaux que nous prévoyons d'utiliser pour une période de 5 ans. Il s'agit du nombre minimal d'animaux nécessaire à l'obtention de données de qualité exploitable et permettant une analyse statistique fiable. Des mesures de RAFFINEMENT seront mises en place durant toute la durée du projet. Les animaux seront hébergés au sein d'un établissement utilisateur agréé dans des conditions d'hébergement favorisant leur bien-être (enrichissement, suivi quotidien par du personnel qualifié). Enfin, des points-limites ont été établis entraînant une prise en charge de l'animal afin d'anticiper toute souffrance et réduire au mieux l'inconfort des animaux suite à la chirurgie (anesthésie, analgésie, gel oculaire, tapis chauffant) jusqu'à leur récupération complète.

14894 Notre équipe s'intéresse aux mécanismes de codage des odeurs et aux processus de plasticité ayant lieu dans le système olfactif. Notre but est de comprendre comment le système olfactif détecte et discrimine les nombreuses odeurs de l'environnement, et d'évaluer l'influence des conditions environnementales ou physiologiques sur le système olfactif.

Nous focalisons nos études sur le fonctionnement de l'épithélium olfactif, un tissu de la cavité nasale impliqué dans la première étape de la perception olfactive. Cet épithélium contient plusieurs types cellulaires et en particulier des neurones qui sont responsables de la détection des molécules odorantes. Ils transforment l'information chimique fournie par chaque molécule odorante en information électrique et la transmettent ensuite au cerveau.

La composition lipidique de l'épithélium olfactif présente de fortes similitudes avec celles d'autres tissus neuronaux comme le cerveau et la rétine. Il contient une teneur élevée en acides gras polyinsaturés (AGPI) oméga-3 et oméga-6 qui jouent un rôle essentiel dans la neurogenèse (processus de formation d'un neurone fonctionnel) et les processus d'inflammation. De nombreux travaux ont montré que la composition lipidique du cerveau et de la rétine peut être modulée par l'apport alimentaire en acides gras. Par contre, on ne connaît pas l'impact des acides gras alimentaires sur la composition et le fonctionnement de l'épithélium olfactif de mammifère.

Le présent projet a pour objectif d'étudier, chez des souris C57Bl6, les effets de régimes alimentaires déséquilibrés en AGPI oméga-3 administrés pendant la gestation et la lactation sur les propriétés physiologiques et moléculaires de l'épithélium olfactif de la progéniture.

Ce projet nécessite de constituer 3 groupes expérimentaux un groupe recevant un régime équilibré, un groupe recevant un régime déficient en acide alpha-linolénique (précurseur des AGPI oméga-3) et un groupe enrichi en AGPI oméga-3 à chaînes longues. Les régimes seront administrés aux mères depuis la conception jusqu'au sevrage des petits mâles et femelles (3 semaines). Ces derniers seront ensuite nourris avec ces régimes jusqu'à l'âge de 8 semaines. Nous évaluerons les

effets de ces régimes sur la composition moléculaire (lipides, ARNm, protéines) de l'épithélium olfactif et des cils olfactifs (protubérance des neurones olfactifs impliquée dans la détection des molécules odorantes). Nous étudierons également leur impact sur l'activité fonctionnelle de l'épithélium olfactif par la technique d'enregistrement d'électro-olfactogrammes (EOG) ex-vivo et sur le comportement olfactif des souris (*in vivo*). Au total, cette étude nécessitera l'utilisation de 834 souris.

La mise en œuvre du projet s'inscrira dans la règle des 3R.

Réduire : Ce projet a été conçu sur la base de travaux antérieurs publiés. Les études effectuées sur le cerveau et la rétine de rongeurs ont fourni de nombreuses informations pour élaborer les régimes (types d'acides gras oméga-3 d'intérêt, teneurs) et le protocole expérimental (stades de développement à étudier). Les études menées sur le système olfactif de souris ont apporté des éléments pour identifier les mécanismes moléculaires à explorer et pour choisir le test de comportement adapté à notre question de recherche. L'ensemble de ces informations a permis de limiter le nombre de groupes expérimentaux et de réduire au minimum le nombre d'animaux dans les groupes. Dans chaque groupe, le nombre d'animaux retenu est le nombre permettant d'évaluer de façon fiable les paramètres d'intérêt, compte-tenu de la variabilité généralement observée dans les analyses prévues. Etant donné le faible nombre d'individus dans chaque série expérimentale, nous utiliserons des tests statistiques non paramétriques (test de Mann-Whitney et/ou test de Kruskal-Wallis) pour interpréter les résultats obtenus.

Raffiner : Chaque étape du projet sera réalisée en réduisant ou supprimant la douleur, en limitant la souffrance et le stress des animaux. D'après les données disponibles dans la littérature et notre expérience, les régimes administrés ne devraient pas induire l'apparition de signes cliniques délétères. Toutefois, tout au long de l'étude, les conditions d'hébergement des souris feront l'objet d'une surveillance quotidienne et les animaux seront soumis à examen clinique hebdomadaire individuel. Tout animal présentant une perte de poids de plus de 10% et/ou une absence d'activité (interaction sociale, exploration, fabrication de nid) sera particulièrement surveillé. Si la perte de poids dépasse 20% et/ou si d'autres signes cliniques (prostration, efflanqué, inactivité) sont observés, les souris seront mises à mort pour des raisons d'éthique. A cette fin, un mélange d'anesthésiques adapté à cette espèce sera administré aux animaux juste avant la mise à mort. Cette procédure sera également mise en œuvre pour la mise à mort des animaux à l'issue des phases d'exposition nutritionnelle.

Remplacement : L'épithélium olfactif est un organe complexe composé de structures neuronales et non neuronales associées à des éléments du système vasculaire. Le fonctionnement coordonné de toutes ces structures assure la détection et le transfert des signaux olfactifs vers le cerveau. A ce jour, il n'existe pas de modèles cellulaires permettant de reproduire de manière fiable le fonctionnement de l'épithélium olfactif. Seule une étude globale de l'épithélium olfactif peut permettre d'évaluer l'impact d'une modulation nutritionnelle sur les paramètres évalués.

14895 Les anticorps sont générés par le système immunitaire chez l'homme ou les animaux en réponse à l'exposition à un immunogène (un immunogène est une molécule capable d'induire une réponse immunitaire) On les retrouve en quantité importante dans le sang.

Ils reconnaissent spécifiquement l'immunogène contre lequel ils ont été générés afin de s'y fixer.

Cette caractéristique fait des anticorps un outil indispensable pour la détection et la quantification de molécules d'intérêt. C'est pourquoi ils ont de très nombreuses applications en recherche et sont utilisés dans de nombreuses techniques.

L'objectif de ce projet est la production d'anticorps poly-clonaux par des cobayes. Ces anticorps sont destinés à être utilisés dans des applications en recherche.

Le cobaye est un animal de laboratoire adapté au développement d'anticorps polyclonaux pour la recherche. Il montre en effet une très bonne réponse immunitaire et permet de récolter une quantité de sang suffisante pour les applications en recherche.

Dans le cadre de cette étude, une attention particulière sera portée au respect de la règle des 3R.

Le remplacement du modèle in-vivo ne peut être envisagé car la réponse immunitaire est un phénomène complexe impliquant la coopération entre de multiples types cellulaires, pour lequel il n'existe pas d'équivalent in-vitro.

Dans un objectif de réduction, nous n'utilisons que la quantité d'animaux strictement nécessaire à l'obtention de la quantité de sérum attendue.

Dans un objectif de raffinement, tous les actes réalisés le sont en conformité avec les bonnes pratiques en expérimentation animale et les recommandations édictées sur le sujet. De plus les cobayes sont observés tous les jours

En fonction des demandes que nous recevons nous prévoyons d'utiliser jusqu'à 50 cobayes par an, 250 cobayes sur 5 ans.

14896 Le syndrome d'apnées obstructives du sommeil, qu'est-ce que c'est ?

Le syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAOS) est un trouble clinique marqué par des pauses respiratoires fréquentes pendant le sommeil, généralement accompagnées d'un ronflement sonore.

Ces pauses privent d'oxygène tout l'organisme pendant quelques secondes et interrompent l'élimination du dioxyde de carbone. Suite à cela, le cerveau déclenche alors un micro-réveil pour permettre la réouverture des voies respiratoires, et la respiration reprend.

Ces petits éveils peuvent se répéter plusieurs fois durant la nuit, si bien qu'il est finalement impossible d'avoir un sommeil reposant. Au réveil, on peut alors ressentir une somnolence excessive qui dure toute la journée, des difficultés à se concentrer ou des maux de tête. La nuit, le ronflement est la caractéristique la plus courante.

Diagnostic et prise en charge

Le diagnostic de SAOS n'est posé qu'après avoir pratiqué une polysomnographie, un examen qui enregistre l'activité du corps pendant le sommeil et une pulsoxymétrie, qui mesure la quantité d'oxygène dans le sang à tout moment.

Le syndrome d'apnées obstructives du sommeil n'est pas une maladie qui menace le pronostic vital en soi, mais il peut entraîner des problèmes graves tels que des maladies cardiovasculaires et cérébrovasculaires.

La maladie peut avoir des répercussions sur la qualité de vie, mais elle est facilement prise en charge. Un des traitements est la ventilation en pression positive continue, qui envoie de l'air à travers un masque dans les voies respiratoires pour qu'elles ne se ferment pas.

Le syndrome d'apnée du sommeil touche entre 5 à 8% de la population française. Du fait de ses conséquences sur la santé (HTA, maladie cardio-vasculaire, Diabète, obésité, trouble de la mémoire et de la concentration, dépression...), il est important de proposer une prise en charge adaptée et personnalisée à chaque patient.

Le traitement par appareil à pression positive continue (dit PPC) est largement plébiscité par les médecins son efficacité thérapeutique est largement démontrée par les études et il est facile et rapide à mettre en place. Plus d'un million de patients sont équipés d'une PPC en France en 2019.

L'orthèse d'avancée mandibulaire est une alternative mécanique au traitement par ventilation par pression positive continue. Bien que les dernières études montrent qu'il n'y a pas d'infériorité au traitement par orthèse par rapport au traitement par PPC dans les indications adéquates, elle est beaucoup moins prescrite. En 2013, 8 000 à 10 000 personnes ont été remboursées pour leur traitement par orthèse d'avancée mandibulaire alors que l'on estime que la population qui pourrait en bénéficier serait plutôt entre 48 000 et 72 000 personnes. On peut expliquer cela notamment par un nombre restreint de professionnels la proposant et le coût (pour le moment) pour le patient plus important à l'initiation.

Un traitement non invasif de l'apnée du sommeil à base d'ondes acoustiques basses fréquences a été développé. Ce traitement repose sur la réalisation d'un dispositif en rupture totale avec les dispositifs actuellement commercialisés.

L'objectif est d'améliorer le confort du traitement en remplaçant la PPC par un collier générateur d'ondes acoustiques activant les muscles pharyngés pour maintenir ouvertes les voies respiratoires. Ce collier n'apportera pas l'inconfort du masque au niveau du visage et évitera le bruit de la machine.

Une première étude a permis de valider l'efficacité du dispositif et il est maintenant nécessaire d'investiguer les mécanismes d'action précis du système afin d'optimiser son fonctionnement. Pour ce faire, l'activité de plusieurs muscles participant à la respiration ainsi que l'électroencéphalogramme doivent être suivis. Pour cela, la technologie utilisée sera la télémétrie, ainsi les mesures seront effectuées en continue, donnant des informations sur le sommeil spontané en sus.

Ce projet de recherche translationnelle comportera une procédure de classe modérée. Au cours d'une chirurgie, deux implants de télémétrie seront mis en place. Après un temps de récupération, une anesthésie légère permet, sur les 4 porcs mis en œuvre dans ce projet, de provoquer un SAHOS (animal sur le dos, tête en flexion). Le collier est testé lors de l'anesthésie. Ceci sera répété 7 fois à raison d'une fois par semaine. Des paramètres tels que l'activité cérébrale (EEG) ou les contractions des muscles (langue, diaphragme) seront étudiés au cours du traitement mais aussi en continue grâce à la télémétrie.

Réduction Le nombre d'animaux a pu être réduit à 4 animaux car la séquence de traitement est répétée 3 fois par session soit 18 fois par animal.

Raffinement La télémétrie permet d'effectuer des mesures sur l'animal en continu et donc d'obtenir une grande quantité de données. Les mesures de l'activité musculaire et de l'EEG pendant le sommeil naturel permettront d'évaluer les caractéristiques du sommeil et d'interpréter plus finement les résultats obtenus au cours de la stimulation sous anesthésie. L'effet de la chirurgie sera amoindri par l'injection d'anesthésique local au niveau des incisions. Le projet est suivi par un pneumologue.

Remplacement Ce projet cherchant à mettre en évidence les mécanismes liés à l'apnée du sommeil et ceux liés aux effets bénéfiques du traitement, l'animal vivant ne peut pas être substitué par une méthode alternative.

14897 La compréhension de la réparation de la peau est un enjeu de santé publique puisqu'elle pourrait permettre l'amélioration du traitement d'épisodes cliniques aigus (brûlure, choc mécanique) et chroniques (eczéma, psoriasis...) qui touchent une grande partie de la population. Malgré l'importance des processus de réparation tissulaire, ceux-ci sont encore mal connus. Des données préliminaires chez l'homme et chez la souris suggèrent que certaines cellules de l'immunité très fréquentes dans la peau synthétisent des molécules favorisant la réparation de la peau. Cependant, leur rôle exact ainsi que la possibilité de les stimuler cliniquement pour augmenter la réparation tissulaire restent des pistes à explorer.

Les objectifs du projet sont donc 1) de déterminer si ces cellules peuvent réellement améliorer la cicatrisation et, seulement si elles le font, nous continuerons le projet afin 2) de comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans cette amélioration et 3) d'augmenter le potentiel de cicatrisation de nos cellules dans une optique thérapeutique applicable à l'homme.

Pour cela, nous utiliserons un modèle murin de cicatrisation cutanée qui reproduit sur la peau de la souris les étapes de cicatrisation observés chez l'homme. Le bien-être de l'animal ainsi que la cicatrisation sont suivis quotidiennement.

Nombre d'animaux pour ce projet 2298 souris. Notre objectif 1 nécessite 36 animaux, et le projet ne sera continué que si nos cellules ont effectivement un rôle protecteur.

Remplacer Des données préliminaires montrent que nos cellules d'intérêt, chez l'homme comme chez la souris, et en dehors de tout dommage tissulaire, sont capables de produire des molécules bénéfiques pour la cicatrisation. Cependant, nous ne savons pas si ces cellules sont effectivement cruciales pour la réparation de la peau dans un contexte pathologique.

Pour tester cela, nous ne pouvons pas utiliser un modèle de peau artificiel. En effet, nos cellules font partie du système immunitaire qui est un système dynamique dont les acteurs (cellules,

molécules) évoluent entre différentes localisations au sein de l'organisme selon des flux très précis. De plus, nous savons déjà que les cellules que nous étudions se spécialisent particulièrement en fonction de l'endroit dans lequel elle sont (elles n'ont pas les mêmes propriétés dans le poumon et dans le foie par exemple). Enfin, chaque organe voire chaque partie d'organe présente un microenvironnement particulier lié à la fois aux cellules qui y sont présentes, à la façon dont elles communiquent ensemble, et surtout de tout ce qu'il s'est passé depuis la création de cet organe (infections, lésions...). Ni les modélisations mathématiques, ni les systèmes *in vitro* ne permettent de reproduire tous ces paramètres, ce qui nous oblige donc à utiliser des animaux.

Réduire Afin de réduire le nombre d'animaux nécessaires, l'étude des mécanismes et de la modulation de nos cellules ne sera réalisée que si l'effet pro-cicatrisant est réellement démontré. De plus, la compilation de données de la littérature et de données déjà générées au laboratoire (sur animal non manipulé), ainsi que des expériences de culture cellulaire nous permettent de limiter le nombre d'hypothèses à tester. Enfin, le nombre de souris à utiliser a été calculé pour obéir aux minima nécessaires à des analyses statistiques valides, condition nécessaire pour une interprétation biologique des résultats. Si possible, lors de l'étude de l'augmentation du potentiel réparateur des cellules, le traitement et le contrôle seront appliqués sur deux plaies différentes de la même souris, ce qui permet de réduire les effectifs requis, tout en limitant la variabilité et donc le nombre de souris nécessaires pour une interprétation biologique robuste.

Raffiner Les animaux seront suivis quotidiennement afin d'assurer leur bien-être et pour surveiller les éventuels signes de douleur, de souffrance ou de stress. Des points-limites ont été établis au-delà desquels les animaux seront sacrifiés. Une attention particulière sera portée aux cicatrices afin d'éviter toute infection.

14898 Nous travaillons sur l'enzyme X et l'effet de l'inhibition de son activité catalytique (confidentiel). L'invalidation de cette enzyme, en combinaison avec des traitements affectant la protéostasie (inhibiteur du protéasome, inducteur de stress du réticulum endoplasmique), est toxique pour les cellules, via l'induction d'apoptose. Notre hypothèse est donc que l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique de cette enzyme pourrait potentialiser l'effet anti-cancéreux des inhibiteurs du protéasome déjà utilisés en clinique comme le Carfilzomib.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons réalisé deux séries d'expériences *in vitro*. Dans la première, nous avons traité des fibroblastes embryonnaires de souris KO pour l'enzyme X par les inhibiteurs de protéasome. Dans la deuxième série d'expériences, nous avons co-traité des cellules cancéreuses avec l'inhibiteur de l'enzyme X plus les inhibiteurs de protéasome. Dans tous les cas, les résultats indiquent que l'inhibiteur de l'enzyme X n'est pas toxique en tant que tel mais augmente la toxicité des inhibiteurs de protéasome. Nous avons donc déjà répondu à l'exigence de remplacement.

L'objectif est maintenant d'évaluer la capacité de l'inhibiteur de l'enzyme X à prévenir le développement de cancers *in vivo*. Le Carfilzomib est utilisé actuellement principalement pour traiter des myélomes et des lymphomes. Nous souhaitons dans cette étude évaluer si son utilisation en association avec l'inhibiteur de l'enzyme X pourrait être étendue aux cancers du sein triple-négatifs qui demeurent aujourd'hui très difficiles à traiter.

Pour répondre à cet objectif, notre projet consiste à effectuer des essais de tumorigenèse en souris immunodéprimées. Nous injecterons des cellules cancéreuses (MDA-MB-231), en sous-cutané dans des souris immunodéficientes (CB17-Scid), puis une fois que le développement tumoral sera détecté, les souris seront traitées avec l'association inhibiteur de l'enzyme X + inhibiteur du protéasome puis suivies pour le développement de la tumeur.

Tout a été prévu dans ce projet pour satisfaire au mieux à la règle des 3R Réduction le nombre d'animaux (306 souris) a été estimé au plus juste pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. De plus, les cellules cancéreuses que nous utiliserons expriment la luciférase et la RFP (Red fluorescent protein), ce qui permet une mesure précise de la taille des tumeurs permettant d'enregistrer l'inhibition attendue même si elle s'avérait faible. Nous prévoyons aussi de pouvoir répéter l'expérience en cas de survenue de problèmes imprévus lors de la première expérience.

Enfin, la procédure N°3, qui cherchera à montrer un effet-dose de l'inhibiteur étudié, ne sera effectuée que si la procédure N°2 a montré une efficacité satisfaisante.

Raffinement ce projet sera conduit dans des conditions d'élevage optimales en animalerie SPF, en portoirs ventilés, avec enrichissement de l'environnement des souris et suivi sanitaire permanent par le personnel de l'animalerie. Les souris seront sacrifiées avant que le volume d'une tumeur ne dépasse 1 cm³. De plus, dans le cas où un phénotype dommageable se développerait au site d'injection ou sur un site éloigné avant ce stade limite ou en cas de tout autre suspicion de souffrance de l'animal, objectivable par exemple par une perte de poids excessive, une baisse de l'activité motrice, une respiration saccadée, une prostration avec dos arrondi, une modification du pelage, une modification importante de la prise alimentaire, ou une nécrose apparente de la tumeur, les souris seront sacrifiées prématurément.

Remplacement Malheureusement, il n'est pas possible de remplacer ces modèles animaux. La souris immunodéprimée est le modèle de référence pour des analyses précliniques concernant des candidats médicaments anti-cancéreux.

14899 L'obésité est un problème majeur de santé publique notamment car elle expose les individus à une myriade de complications telles que le diabète de type 2, l'hypertension artérielle et les pathologies cardio-vasculaires. Selon l'organisation mondiale de la santé, plus de 650 millions de personnes étaient obèses en 2016, soit près de 13% de la population globale. Son incidence a presque triplé entre 1975 et 2016.

L'infiltration du tissu gras (adipeux) par des cellules immunitaires et leur production de molécules inflammatoires joue un rôle crucial dans le développement des complications associées à l'obésité. Les cellules en cause sont les macrophages. Elles sont les sentinelles du système immunitaire. Toutefois, les facteurs qui initient ou régulent l'activation des macrophages du tissu gras au cours de l'obésité sont encore méconnus. Notre équipe a caractérisé une enzyme, nommé DNase1L3, qui semble jouer un rôle important dans les processus d'obésité d'après nos observations préliminaires *in vitro*. Nous comptons maintenant utiliser un modèle de souris qui est déficient pour cette enzyme (la DNase1L3) pour confirmer *in vivo*, nos résultats car la multiplicité des différents acteurs cellulaire et moléculaire dans le processus de l'obésité rend pour l'instant impossible une modélisation *in silico* ou *in vitro*.

Afin de réaliser l'ensemble de nos expériences, 800 souris sont demandées sur une période de 3 ans. Dans le respect de la règle des 3R, le nombre d'animaux a été défini d'un point de vue statistique afin de réduire et optimiser leur nombre. De plus, des approches ex-vivo seront utilisées pour répondre à certaines questions spécifiques relatives à ce projet afin de remplacer au mieux l'utilisation des animaux. Néanmoins les souris déficientes en DNase1L3 représentent un modèle d'étude particulièrement adapté à nos objectifs. Il nous permettra d'évaluer l'impact du déficit génétique en DNase1L3 sur le développement de l'obésité induite par une exposition à une alimentation riche en graisse, qui représente un modèle très proche des patients obèses. Afin de respecter la notion de raffinement, le bien-être de nos animaux sera pris en compte (hébergement en cages collectives, enrichissement de l'environnement et points limites précoces adaptés) de leurs naissances à leurs morts afin d'éliminer ou de réduire au minimum toute douleur, souffrance, angoisse et tout dommage durable susceptible d'être infligé à ceux-ci.

14900 Les infections communes, comme celles de la mamelle, dans les élevages ont des effets majeurs sur la santé et le bien-être des animaux, ainsi que sur la qualité nutritionnelle et microbiologique des produits alimentaires d'origine animale. Notre laboratoire s'intéresse aux facteurs influençant l'immunité mammaire chez les bovins et les ovins dans l'objectif de réduire le recours aux traitements antibiotiques contre les infections mammaires.

Ce projet s'intéresse au rôle d'une protéine régulatrice de la réponse immunitaire. Son rôle dans la croissance a été bien étudié mais son rôle dans l'immunité est beaucoup moins connu. Une mutation ponctuelle de cette protéine, qui invalide sa fonction, a été identifiée comme prédisposant les brebis

aux infections. Nous avons développé un modèle chez la souris pour étudier les conséquences biologiques fonctionnelles de cette mutation ponctuelle.

Dans ce but, nous aurons recours à des modèles d'étude de l'inflammation et des processus infectieux provoqués respectivement par des ligands synthétiques et les bactéries qui sont les plus couramment responsables des mammites chez les ruminants. Pour cela, une approche innovante en cohérence avec la règle des 3R sera mise en œuvre. Le suivi de l'infection et de la réponse immunitaire et inflammatoire seront réalisés par des techniques d'analyse de cellules isolées et par une approche multiplexe de dosage des cytokines.

Ainsi, ce modèle murin permet de s'affranchir de l'inoculation à des animaux d'élevage, protocole qui serait beaucoup plus dommageable. Ces expériences ne peuvent être réalisées qu'à l'échelle de l'organisme avec des animaux vivants et ne peuvent être reproduites *in vitro* puisqu'elles impliquent des interactions entre les différents acteurs du système immunitaire de l'organisme, après contact avec les bactéries en multiplication. Nous utiliserons pour cette étude 100 souris mâles, et 60 souris femelles au maximum. Une étude pilote sur un faible nombre de souris permettra de déterminer les temps de prélèvements à retenir pour obtenir suffisamment d'informations tout en limitant au maximum le nombre d'animaux utilisés et la douleur.

D'autre part, les différentes étapes du protocole seront optimisées pour veiller au respect du bien-être animal et ainsi participer au raffinement de la procédure. Les cages bénéficieront d'un enrichissement adapté (igloo, tunnel et/ou coton). Tout animal présentant des signes de douleur ou de léthargie sera euthanasié par dislocation cervicale. Des points limites ont été établis dans ce but en fonction de critères reposant sur l'observation de signes cliniques (niveau d'activité, agressivité, posture, réaction à la manipulation, toilettage, vocalisation) et physio-pathologiques (température, perte de poids, déshydratation).

Une meilleure compréhension du rôle de cette protéine dans la modulation de la réponse immunitaire suite à une infection permettra d'améliorer la santé et le bien-être des animaux d'élevage, ainsi que la durabilité de ces élevages en lien avec le fond génétique de l'hôte.

14901 Avec 10 millions de personnes atteintes en France, l'arthrose est une pathologie qui représente un réel enjeu socio-économique. En l'absence de traitement curatif, les Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens (AINS) sont largement prescrits, pour enrayer le phénomène inflammatoire responsable du cercle vicieux entraînant la destruction du cartilage, et ce malgré leurs effets secondaires importants.

Ce projet d'expérimentation animale, s'inscrit dans un projet plus large dont l'objectif est de concevoir de nouveaux AINS ciblant spécifiquement le site arthrosique afin de diminuer les effets indésirables associés couramment à l'utilisation des AINS. En effet, malgré leur large prescription, ces derniers sont associés à une large toxicité digestive et cardiaque ce qui nécessite une utilisation sur des périodes courtes et à la dose minimale efficace avec des précautions particulières chez les personnes âgées, les insuffisants rénaux ou les personnes présentant des antécédents cardiovasculaires ou gastro-intestinaux^{1,2}.

Exploitant la stratégie de « Drug Delivery » brevetée et développée au laboratoire, de nouveaux anti-inflammatoires dérivés d'anti-inflammatoires non stéroïdiens utilisés actuellement en clinique ou médecine de ville (diclofénac et naproxène), et ciblant spécifiquement les protéoglycanes du cartilage, ont été synthétisés et caractérisés par les chimistes de notre unité. Les différents dérivés sont actuellement en cours d'évaluation *in vitro* notamment en terme de stabilité, d'affinité vis à vis de l'agrécan (principal protéoglycane du cartilage) et d'activité anti-inflammatoire. Ces résultats couplés aux résultats obtenus suite au test à la carragénine envisagé dans cette saisine nous permettront de sélectionner au maximum 6 molécules dérivées du diclofénac ou du naproxène qui seront ensuite évaluées sur dans un modèle *in vivo* d'arthrite, modèle connu pour son caractère inflammatoire important, et obtenu après injection par voie intra-articulaire d'adjuvant de Freund.

Le nombre d'animaux inclus dans ce projet a été optimisé conformément à la règle des 3R est de 986 souris au maximum sur 5 années.

Ce nombre a été calculé afin de garantir une valeur statistique à l'étude menée.

En effet, de nombreuses études *in vitro* réalisées en amont ont permis de remplacer l'utilisation des animaux. Cependant, ces études sur cellules ne peuvent pas se substituer aux études sur un organisme entier notamment dans le cas du développement d'une stratégie de vectorisation. De plus, l'étude sur un organisme entier permet d'évaluer les effets potentiellement indésirables sur d'autres organes. Au cours de ce projet, le nombre d'animaux nécessaire est réduit au maximum en sélectionnant uniquement les expérimentations essentielles.

La surveillance quotidienne des animaux permettra de déceler les premiers signaux de stress, de douleurs ou d'inconfort pour l'animal. Les conditions d'hébergement seront optimisées (portoirs ventilés, température, hygrométrie, luminosité, densité animale, enrichissement de milieu avec coton pour la nidification, bâtonnet de bois pour ronger et cabane de cachette).

Au final ce projet devrait permettre de valider l'intérêt de la vectorisation d'anti-inflammatoires dans l'amélioration de l'efficacité et la diminution des effets indésirables.

14902 La maladie d'Alzheimer (MA) est une pathologie neurodégénérative progressive qui est caractérisée dans ses stades précoces par des altérations de la mémoire en relation avec des déficits de la fonctionnalité synaptique dans l'hippocampe, une zone cérébrale clé dans l'encodage et le traitement de différentes modalités mnésiques. De nombreuses données cliniques obtenues chez des patients mais également des données expérimentales obtenues sur des modèles murins de la MA montrent qu'il existe un dimorphisme sexuel avec une apparition plus précoce et un développement plus rapide de la pathologie chez les souris femelles par rapport aux souris mâles. Ce projet constitue une extension d'un travail de thèse récemment réalisé au sein de l'équipe. Il vise à caractériser comment la plasticité du transfert d'information, un des mécanismes utilisés par le cerveau pour l'acquisition et la restitution de traces mnésiques, est affecté par la MA. A cette fin, un modèle de la MA basé sur des souris génétiquement modifiées est utilisé. L'approche expérimentale consiste dans l'enregistrement des propriétés électriques (électrophysiologie) de neurones de l'hippocampe sur des tranches de cerveaux de souris femelles contrôle et génétiquement modifiées. Un total de 120 animaux sera utilisé dans ce projet.

Dans le respect de la règle des 3R (Réduction, Raffinement, Remplacement) les mesures suivantes seront prises :

(1) Le même animal sera utilisé pour différents protocoles électrophysiologiques afin de réduire le nombre total (réduction);

(2) Des conditions d'enrichissement du milieu pour les animaux (nids, tunnels, maintien de groupes sociaux stables) sont utilisées afin qu'ils puissent s'adonner à des comportements naturels (fouissage, redressement, fabrication de nids) sans pour autant perturber de façon majeure la fonction synaptique. Ces protocoles ont été développés et raffinés par les membres du laboratoire depuis plusieurs années pour maximiser la simplicité et l'efficacité réduisant ainsi la souffrance des animaux (raffinement).

(3) La souris constitue un modèle éprouvé pour l'étude des mécanismes de transmission et plasticité synaptique. A ce jour, les seuls modèles animaux de la MA sont des modèles murins transgéniques (remplacement).

Afin de réduire la douleur, les procédures expérimentales sont réalisées sous anesthésie et en présence d'une couverture analgésique. Un suivi post opératoire est réalisé durant 4 jours. Si un signe de douleur apparaît, un protocole de nursing est mis en place et une injection de NaCl et/ou d'analgésique est réalisée.

Des points limites suffisamment précoces sont définis pour éviter des souffrances aux animaux avec la mise en place de mesures pour les soulager comme une réhydratation, le réchauffement, une nourriture adaptée, des traitements vétérinaires si nécessaire.

14903 Notre société veut proposer aux institutions publiques et privées la réalisation de modèles expérimentaux de tumeurs mammaires chez la souris. Les modèles que nous proposons permettront d'évaluer l'effet bénéfique ou délétère de nouvelles approches thérapeutiques dans un contexte en situation d'échec thérapeutique. Ces approches sont basées sur la restauration de

l'activité du système immunitaire afin qu'il puisse être « de nouveau » efficace et limiter ainsi la progression tumorale et favoriser l'élimination de la tumeur. Ces approches sont basées par exemple sur l'utilisation d'anticorps innovants ciblant des facteurs impliqués dans l'échappement immunitaire tumoral.

Nous proposons aux industries pharmaceutiques et aux sociétés de biotechnologie, développant des approches thérapeutiques innovantes d'évaluer l'efficacité de leurs composés sur différents modèles murins syngéniques bien décrits dans la littérature. Ces modèles sont basés sur l'implantation de cellules tumorales sur des souris immunocompétentes de même fonds génétiques. Dans certain cas d'études, nous proposerons aussi des modèles basés sur l'inoculation de cellules tumorales humaines sur des souris immunodéficientes.

Nous estimons un nombre de 20 études par an comprenant en moyenne 100 souris par étude – i.e. pour un total sur 5 ans à 10000 souris.

Ces expériences seront réalisées dans les meilleures conditions éthiques en respectant la règle des 3Rs (Réduire, raffiner, remplacer) et conformément à la législation en vigueur. A ces fins, les composés utilisés auront été préalablement testés *in vitro* par le partenaire, afin de déterminer les doses requises, de s'affranchir de la toxicité des composés et de réduire le nombre d'animaux. Aussi, nous aurons recours à des techniques d'imagerie qui nous permettront d'éviter le sacrifice des animaux et ainsi de faire des suivis d'un même animal sur toute la durée de l'étude.

Afin de remplacer les animaux si des tests complémentaires sont nécessaires ils seront effectués *in vitro*. Néanmoins, les modèles de cancers sont des modèles intégrés qui nécessitent l'utilisation de l'expérimentation animale afin d'être au plus proche de la physiopathologie. Les groupes sont de 20 animaux pour obtenir des tests statistiques robustes, évitant ainsi de réitérer une étude. Les animaux des études sont hébergés dans des conditions permettant le respect et le bien-être des animaux (en fratrie) et avec un milieu enrichi (jouet). Les animaux sont suivis quotidiennement afin de détecter tout inconfort ou souffrance. Une étroite collaboration entre le personnel de l'animalerie et notre équipe d'expérimentateurs permet d'intervenir immédiatement sur les animaux en cas de nécessité.

14904 Au cours de la SPA, le facteur génétique principal qui multiplie par 100 le risque de développer cette maladie est le HLA-B27. Cette association a été démontrée il y a plus de 30 ans, cependant, et malgré de nombreuses recherches, nous ne savons toujours pas à l'heure actuelle la raison pour laquelle le HLA-B27 confère cette prédisposition. Il existe plusieurs modèles de la maladie chez la souris mais qui majoritairement ne reproduisent qu'une partie de la pathologie humaine. Un seul modèle animal permet l'étude de la plupart des phénomènes cliniques observés chez les patients, le modèle du rat transgénique HLA-B27. Ce modèle est considéré comme le modèle le plus pertinent de la pathologie. Dans ce modèle surviennent spontanément toutes les manifestations de la spondylarthrite ankylosante (inflammation intestinale chronique qui se manifeste par une diarrhée, atteintes articulaires de type arthrites aiguës, chroniques ou récidivantes, prédominant aux pattes arrière dont la survenue est aléatoire certains animaux développent également une inflammation de l'oeil (uvéite) et des testicules (orchite). Notre objectif principal est la compréhension du rôle pathogène du HLA-B27 vis à vis de la maladie en utilisant ce modèle animal. La dissection des mécanismes impliqués dans l'association HLA-B27/SPA revêt une importance toute particulière car la spondylarthrite est une maladie fréquente, touchant 0,45% de la population adulte en France, soit environ 200.000 personnes. De plus, peu de traitements sont efficaces à l'heure actuelle. Des études de notre laboratoire utilisant le modèle de rats transgéniques qui expriment le gène HLA-B27 (soit sur le fond génétique FISHER soit sur le fond LEWIS) et qui développent la spondylarthrite ont révélé le rôle crucial des cellules dendritiques et des lymphocytes TCD4+ dans le déclenchement de la maladie. Cependant les mécanismes précis impliqués dans ce phénomène ne sont pas encore élucidés. Un objectif majeur de notre projet est d'étudier plus précisément les conséquences de l'expression du gène HLA-B27 dans ces deux types cellulaires. Une meilleure compréhension du rôle pathogène du HLA-B27 vis à vis de la maladie peut conduire à la proposition de nouvelles stratégies thérapeutiques. Les expériences consisteront à comparer les rats malades (transgéniques) à des rats contrôles (non-transgéniques ou portant un transgène

contrôle non associé à la maladie le HLA-B7). Pour réduire le nombre d'animaux utilisés dans ce projet, les organes (rate et ganglions principalement mais aussi intestin, caecum, colon, yeux.) et pattes de chaque rat seront prélevés après sacrifice par asphyxie au CO₂ pour ensuite être utilisés par les différents expérimentateurs à des fins différentes. Dès que possible, afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, nous utiliserons aussi des lignées de culture primaire établies dans notre laboratoire pour disséquer des mécanismes cellulaires *in vitro*. Etant donné que les deux caractéristiques majeures de la SPA chez le rat HLA-B27 sont l'apparition d'une diarrhée aiguë (colite) vers 6 semaines d'âge et d'une inflammation au niveau des articulations (arthrites) vers 10-12 semaines d'âge, nous pourrions, selon le projet, nous limiter à observer seulement une amélioration ou une aggravation du symptôme le plus précoce (à savoir la diarrhée) et ensuite sacrifier les animaux afin de limiter leur souffrance. Pour les expériences ex-vivo, nous comptons utiliser en moyenne 6 animaux par expérience (2 rats HLA-B27, 2 rats contrôles non transgéniques et 2 rats contrôles HLA-B7, allèle non associé à la maladie), ce qui représente 240 rats par an. Des données récentes de notre laboratoire ont révélé le rôle crucial de la molécule ICOS dans la régulation des cytokines pro-inflammatoires par les lymphocytes T chez les rats HLA-B27. Grâce à une collaboration, nous prévoyons d'établir une lignée de rat HLA-B27 avec la mutation du gène ICOS générée (rat HLA-B27-ICOS-KO). Si une protection vis-à-vis du développement de la SPA est observée chez ces animaux, et dans le but de proposer une nouvelle stratégie thérapeutique, un traitement avec un anticorps anti-ICOS sera envisagé. Pour ces expériences nous aurons 4 groupes (rats transgéniques et rats contrôles traités par anti-ICOS ou le véhicule PBS), avec 8 animaux par groupe, ce qui représente 32 animaux par essai (1200 rats au total). D'autres projets en cours dans le laboratoire pourront conduire à d'autres essais cliniques, utilisant un nombre similaire d'animaux.

14905 La péritonite est une inflammation aiguë du péritoine le plus souvent d'origine infectieuse. Chez l'homme, selon l'origine de l'infection, les péritonites sont classées en trois entités distinctes (primaire, secondaire et tertiaire). Les péritonites secondaires représentent 90% des péritonites aiguës. Elles sont dues à une infection mono bactérienne du péritoine. Les causes les plus fréquentes d'une péritonite sont l'infection à staphylocoque, à pneumocoque, les levures et les ascites chez le patient cirrhotique. Actuellement, la péritonite est parmi les dix premières causes de mortalité dans les unités de soins intensifs.

Le modèle clinique le plus largement utilisé est l'administration du lipopolysaccharide (LPS), composant la paroi des bactéries Gram- ou le zymosan A extrait de la membrane des levures dans la cavité péritonéale pour générer une inflammation aiguë du péritoine. L'administration de ces deux composés provoquent une réaction inflammatoire caractérisée par une perméabilité vasculaire, la libération de médiateurs comme l'histamine et la prostaglandine et un afflux important de neutrophiles dans les 6 premières heures. Ce modèle permet d'induire une péritonite proche de celui observé chez l'homme.

La phase préclinique qui consiste à l'étude de l'action des agents pharmacologiques *in vivo* chez le rongeur est une étape essentielle dans le développement de médicaments. Ce projet a pour but de tester de nouveaux médicaments anti-inflammatoires. Le LPS ou le zymosan A sera administré aux animaux par voie intrapéritonéale. Les animaux seront ensuite mis à mort au bout de 6h ou 24h afin d'analyser différents paramètres immunologiques. Ceci permettra d'étudier l'efficacité des molécules testées sur le développement de la maladie.

L'animal utilisé est la souris C57BL/6 ou BALB/c sauvage. L'animale est manipulé de façon à minimiser les situations douloureuses et stressantes. Une surveillance quotidienne des animaux est effectuée pendant la période d'acclimatation et d'expérimentation. Les conditions d'hébergement sont celles requises par l'annexe II de l'arrêté relatif à l'agrément des EU. Les animaux seront mis à mort selon la réglementation en vigueur.

Le projet représente un ensemble d'études types. Le nombre d'études réalisées durant la période de validité de l'autorisation va dépendre des résultats obtenus et du nombre de molécules à tester. Le projet pourra comporter jusqu'à 20 études, incluant au maximum 90 animaux, soit 1800 animaux au total.

A ce jour, l'animal de laboratoire reste le seul recours fiable et pertinent permettant d'étudier les mécanismes d'inflammation et de régulation. Ce projet sera réalisé en respectant les principes fondamentaux de l'expérimentation animale

Remplacement le modèle animal est fondamental dans notre cas, puisque l'étude de l'inflammation et de la pathologie ne peut se faire que sur un organisme vivant entier.

Raffinement les animaux sont observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être et d'éviter au maximum la douleur et le stress au moment de l'expérimentation. Des points limites sont mis en place et appliqués pour limiter la souffrance de l'animal. (Cf tableaux points limites 3.4.13).

Réduction le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement pertinents et reproductibles, évitant ainsi de refaire plusieurs fois les mêmes expérimentations.

14906 La demande concerne la production de lapins transgéniques chez lesquels le transgène permettra la synthèse d'une protéine A fluorescente (nommée AF) dont le rôle et la localisation sont en tout identiques à ceux de la protéine A native. La protéine A est une protéine intracellulaire, indispensable aux déplacements des chromosomes au cours des divisions cellulaires (mitose et méiose). Il n'existe pas d'outils efficaces pour détecter la protéine A dans les cellules. Grâce à sa fluorescence, la protéine AF sera localisée beaucoup plus facilement que la protéine A, ce qui permettra de mieux connaître les mécanismes de ségrégation des chromosomes au cours des premières divisions cellulaires de l'embryon et au cours de la formation des gamètes (ovocytes et spermatozoïdes).

Une telle étude n'a encore jamais été faite chez un mammifère.

La fluorescence est due à l'addition d'un motif particulier dans la protéine A, motif naturellement présent chez des organismes marins (méduses, coraux). Ce motif fluorescent a déjà été rajouté à d'autres protéines pour une utilisation en transgénèse chez de nombreuses espèces de mammifères, de poissons, d'amphibiens et d'insectes, et n'a jamais provoqué l'apparition d'un effet délétère. De plus, des drosophiles transgéniques exprimant le gène AF ont déjà été produites, sans effet délétère sur l'insecte. Nous supposons qu'il en sera de même chez le lapin.

Les animaux génétiquement modifiés obtenus seront toutefois surveillés pour détecter toute altération éventuelle de leur état de santé.

Le gène AF sera ajouté par injection d'ADN dans des embryons unicellulaires. Ces derniers auront été récupérés par lavage des voies génitales prélevées après abattage de femelles traitées par traitement de superovulation. 20 femelles "donneuses" seront mises à mort pour récupérer 300 embryons. Après injection, les embryons seront transférés dans les voies génitales de femelles "receveuses" traitées hormonalement pour développer une gestation. 20 femelles receveuses seront utilisées.

Dix à quinze jours après la naissance, la réussite de l'intégration de l'ADN injecté sera recherchée dans le génome des petits; les animaux génétiquement modifiés (ADN intégré) seront conservés pour générer chacun une lignée par croisement avec d'autres lapins. Les animaux non génétiquement modifiés (pas d'intégration de l'ADN) seront euthanasiés rapidement.

Pour chaque lignée obtenue, des embryons et/ou du sperme seront congelés pour conserver la lignée.

Aucun modèle "*in vitro*" ne peut remplacer les animaux dans ce protocole. En effet, un des objectifs est d'observer le comportement de la protéine AF dans les gamètes pendant la méiose puis après la fécondation au cours des premières étapes du développement de l'embryon. Actuellement, on ne sait pas mettre en culture des fragments d'ovaires et de testicules pour produire des gamètes ni pour observer le déroulement de la méiose. De plus, chez le lapin, la fécondation *in vitro* à partir de gamètes qui auraient été collectés sur des animaux n'est absolument pas maîtrisée. Il est donc nécessaire d'utiliser des animaux pour pouvoir étudier ces phénomènes.

Nous veillerons utiliser le plus petit nombre d'animaux en suivant les procédures suivantes :

- 1- Le traitement de superovulation des femelles permet d'augmenter le nombre d'embryons produits par femelle et donc de mettre à mort le moins de femelles "donneuses" possible.
 - 2- Notre objectif est d'obtenir au moins 3 lapereaux génétiquement modifiés. Dès que ces trois lapereaux seront obtenus, la collecte d'embryons sera arrêtée et aucune femelle ne sera ni traitée hormonalement ni mise à mort ni opérée pour des transferts d'embryons.
 - 3- Chaque femelle receveuse pourra recevoir 30 embryons par transfert, nombre classiquement adopté pour cet acte, qui permet d'utiliser peu de femelles tout en obtenant un bon taux de gestation. Toutes les précautions seront prises pour gérer de façon optimale les douleurs éventuellement engendrées :
 - - surveillance des animaux dans l'élevage pour détecter les signes d'altération de la santé. Les procédures opératoires seront raffinées autant que possible (anesthésie, analgésie, soins post opératoires).
 - - demande d'intervention auprès des vétérinaires présents sur le centre (dans l'unité, au sein de l'unité élevage du centre) ou le vétérinaire sanitaire responsable du bâtiment. Les recommandations du vétérinaire seront alors suivies pour soigner l'animal ou supprimer la douleur. Si les soins n'apportent aucun résultat positif, l'animal sera euthanasié.
 - - dans le cas de femelles en gestation, si la mise bas n'a pas eu lieu à la date théorique, une détection de la gestation pourra être faite (échographie, palpation). Sur avis du vétérinaire, une induction hormonale de la mise bas ou une césarienne pourront être pratiquées et les petits adoptés par une femelle de l'élevage au cas où la mère ne serait pas capable d'allaiter ses petits.
- Des précautions comportementales seront mises en place les animaux seront isolés (1 animal par cage) après leur sevrage (7 semaines après la naissance environ). Les cages sont grillagées ce qui permet aux animaux d'avoir des contacts visuels. Chaque cage est agrémentée d'une mezzanine pour permettre à l'animal de se déplacer dans un plus grand espace. Des enrichissements seront proposés aux animaux (balles type ping-pong). L'environnement (bruit, odeurs, lumière, température, hygrométrie) est contrôlé et maintenu stable au cours du temps.

14907 CONTEXTE

L'adénocarcinome pancréatique fait partie des cancers les plus agressifs. Quel que soit le traitement, le taux de survie global à 5 ans est inférieur à 5%. Cette maladie est souvent diagnostiquée à un stade avancé et, par conséquent, seulement 15% à 20% des patients sont candidats à une résection chirurgicale. Environ 30% à 40% des patients ont une maladie métastatique au moment du diagnostic et dans ces cas, la survie est d'environ 9 mois. Les 30% à 40% restants des patients ont un cancer pancréatique localement avancé au moment du diagnostic, leur survie globale médiane est d'environ 1 an. Bien que de nouveaux protocoles de chimiothérapie entraînent une survie améliorée, le pronostic pour le cancer pancréatique localement avancé reste sombre et sans perspective de survie à long terme.

Il a été démontré dans un premier temps qu'il était possible de détruire du tissu pancréatique par un traitement par ultrasons focalisés à haute intensité (HIFU). L'inconvénient de la technique est qu'il a été observé des occlusions des vaisseaux très proches des zones à traiter. Une séquence de traitement a été mise au point permettant l'acquisition du signal Doppler, évaluant le flux dans l'artère, au cours de pause durant le traitement HIFU. Cette séquence a montré qu'il était possible de prévenir l'occlusion du vaisseau et donc d'arrêter le traitement en amont.

OBJECTIFS

Objectif Le but est d'observer le comportement des vaisseaux traités à moyen terme et de vérifier l'innocuité du traitement.

TYPE DE PROJET/PROCEDURES/ESPECE ANIMALE/SORT DE L'ANIMAL

Ce projet de recherche translationnelle d'une durée maximale de 1 an mettra en œuvre 3 porcs. Le modèle expérimental est représenté par l'artère mésentérique de l'animal qui présentent l'intérêt d'avoir une taille (5 mm de diamètre) sensiblement identique à l'artère mésentérique humaine qui sera incluse dans les protocoles de traitement clinique des tumeurs pancréatiques. Après de

nombreux essais *in vitro* et *ex vivo*, il est indispensable à ce stade de travailler sur l'animal entier pour évaluer la précision du traitement, les effets sur les tissus à proximité et les vaisseaux en présence du flux sanguin.

Au cours de la procédure, 3 animaux maximum subiront une laparotomie sous anesthésie générale puis seront suturés, réveillés et maintenus sous observation pendant 15 jours, temps permettant d'évaluer les éventuels dommages de l'artère et seront ensuite mis à mort et autopsiés.

CONFORMITE AVEC LES 3R

Réduction 3 animaux correspondent au nombre minimal pour montrer la sécurité de la procédure. Un traitement sur la vessie et sur la peau seront effectués en test préliminaires d'un autre projet dans un but de réduction.

Raffinement Le protocole d'anesthésie a été mis au point afin d'éviter toute souffrance. La chirurgie est effectuée par un chirurgien expérimenté. Un protocole antidouleur pendant et après la chirurgie sera mis en place avec un suivi très serré. Le suivi est facilité par un scoring qui reflète l'état de l'animal et qui permet facilement de prendre la décision d'arrêt de la procédure pour l'animal.

Remplacement Les mises au point des techniques HIFU et Doppler ont été au préalable évaluées *in silico* et testées *ex vivo* ce qui a permis de repousser le passage à l'animal.

14908 Toute tumeur est un ensemble hétérogène de cellules transformées (aussi appelées cancéreuses) et de cellules normales non cancéreuses dont un contingent très important de cellules immunitaires. Les lymphomes sont un type de cancer survenant dans un ganglion à partir d'un globule blanc appelé le lymphocyte B. Un des sous-types appelé lymphome folliculaire reste incurable malgré les récentes avancées thérapeutiques. Dans ce lymphome, l'infiltrat de cellules immunitaires joue un rôle dans le devenir de la maladie mais la contribution de chacun de ses composants semble différente en fonction du type de traitement utilisé (chimiothérapie ou immunothérapie). C'est particulièrement le cas pour 2 types de cellules immunitaires les macrophages et les lymphocytes T. Il est donc nécessaire pour les nouveaux médicaments en évaluation comme le lénalidomide ou les nouvelles immunothérapies de comprendre les mécanismes d'action impliquant *in vivo* ces cellules.

En biologie immunologique, il est impossible de récapituler la séquence des événements conduisant la réaction immunitaire dans un système cellulaire *in vitro*, même en utilisant un morceau de tumeur, car celle-ci interagit continuellement avec le milieu extérieur. Seul un modèle à l'échelle d'un organisme vivant peut reproduire la complexité des interactions entre les différentes cellules du système immunitaire. Malheureusement, il n'existe à l'heure actuelle aucun modèle animal reproduisant fidèlement les différents aspects biologiques humains de la maladie. Un modèle de xénogreffe de tumeur primaire de lymphome folliculaire chez la souris a donc été mis au point. En implantant chez l'animal un morceau de tumeur humaine intact, les différents composants cellulaires sont préservés et peuvent être étudiés sous l'influence de divers traitements. Nous avons choisi d'utiliser des souris profondément immunodéficientes (souris NSG) pour favoriser la prise de tissus humains. De plus, la lignée de souris utilisée porte des mutations génétiques additionnelles permettant de réduire au maximum l'activation des lymphocytes humains présents dans le greffon tumoral contre les cellules murines,

L'objectif de ce projet est de connaître précisément les modifications induites par ces nouveaux traitements sur les cellules immunitaires intratumorales et de fournir ainsi un rationnel étayé pour optimiser leurs combinaisons.

Tout d'abord, le modèle de xénogreffe sera finement caractérisé quant à l'évolution des différents sous-types de cellules immunitaires dans un contexte normal (sans traitement) au cours du temps. Dans un 2ème temps les souris seront traitées par lénalidomide puis les tumeurs récupérées pour une caractérisation histologique et un tri des macrophages et des lymphocytes T en vue d'une analyse moléculaire détaillée.

De plus, pour comprendre quels mécanismes confèrent une résistance au lénalidomide et à ses combinaisons thérapeutiques, nous traiterons des souris implantées puis récupérerons la tumeur

pour en trier les lymphocytes B et analyser au niveau unicellulaire les mutations acquises au cours des traitements.

Une autre question, plus fondamentale et traitée indépendamment, concerne l'origine des macrophages infiltrant les tumeurs de lymphome, qui reste à l'heure actuelle inconnue. Le modèle de xénogreffe permettra aussi de modéliser la contribution du compartiment sanguin d'où proviennent les monocytes qui peuvent s'extravaser et se différencier localement en macrophages.

Dans une 3ème étape, ce modèle sera modifié pour étudier l'effet de certaines immunothérapies. A cet effet, des souris implantées avec un lymphome folliculaire recevront aussi des lymphocytes T purifiés autologues c'est-à-dire provenant du même patient que le fragment tumoral. Les animaux recevront ensuite des anticorps thérapeutiques anti-PD-1 et/ou du lénalidomide et l'activité antitumorale des traitements sera mesurée par IRM.

Pour atteindre les objectifs scientifiques du projet, un nombre de 468 souris sera utilisé en ajoutant 40 souris reproductrices.

La règle des 3R sera respectée

- le Remplacement : les événements géniques physiologiquement impliqués dans le développement lymphocytaire B et pathologiquement impliqués dans le développement des lymphomes sont à l'heure actuelle impossibles à reproduire *in vitro*. C'est pourquoi il nous est indispensable de travailler dans un contexte *in vivo* où ils ont lieu.

- la Réduction : afin de réduire le nombre d'animaux nécessaires, les expérimentations ont été mises en place de manière à utiliser le moins de souris possible tout en extrayant le plus d'informations, notamment en utilisant plusieurs organes (moelle osseuse, ganglions, rate et sang) pour réaliser les différentes analyses sur un même animal.

- le Raffinement : les animaux sont élevés dans des conditions adaptées à savoir des locaux confinés, des portoirs ventilés, de l'eau et de la nourriture ad libitum, ainsi qu'un maximum de 5 animaux/cage. Egalement aucun animal ne sera maintenu seul dans sa cage.

Les points limites sont établis de façon à détecter le plus précocement possible les signes de souffrance des animaux basés sur les symptômes cliniques de la maladie du greffon contre l'hôte qui pourraient éventuellement survenir. De plus, les souris seront aussi étroitement surveillées pour l'apparition d'une altération de l'état général lié à la progression de leur lymphome. Les animaux recevront une anesthésie et/ou analgésie adaptée à chaque procédure expérimentale.

14909 L'induction de colite chez la souris représente un bon modèle d'étude de maladies inflammatoires intestinales chroniques de l'intestin chez l'Homme. Ce type de pathologie telle que la maladie de Crohn ou encore la rectocolite hémorragique affectant plus de 150 000 personnes en France est en constante progression et concerne des patients de plus en plus jeunes.

Ce projet pédagogique concerne les étudiants de la licence professionnelle intitulée « études moléculaires, cellulaires et intégrées des moléculaires bio-actives ». Cet enseignement va permettre l'exploration et l'évaluation, à des fins pédagogiques et manipulatoires, de l'état inflammatoire intestinal par des analyses histologiques et moléculaires, avec notamment le dosage de cytokines pro-inflammatoires (TNF α et IL1 β) et de l'activité de la myéloperoxydase au niveau du tissu colique, reflétant ainsi la réponse de l'organisme sur le site inflammatoire.

Le remplacement de l'animal n'est pas possible, dans ce type d'étude, car il est nécessaire de prendre en compte les conséquences tant structurales (histologiques) que fonctionnelles (biochimiques et moléculaires) d'une inflammation colique sur l'ensemble de l'organisme. Des souris Balb/C mâles, âgées de 6 à 8 semaines, sont utilisées pour cette induction.

L'induction de l'inflammation colique sera réalisée par administration orale dans l'eau de boisson de DSS (Dextran Sulfate Sodium) à deux concentrations différentes pendant 10 jours.

Pour la réduction du nombre d'animaux, les étudiants (au nombre de 20) sont regroupés en binôme. Ce projet nécessite au total 30 souris par année d'enseignement.

Chaque binôme d'étudiants suivra 3 souris 1 témoin et 2 traitées respectivement à 1 et 2% de DSS. Le nombre d'animaux est réduit au maximum une souris témoin (référence pour comparaison

pédagogique) et 2 souris traitées avec deux concentrations de DSS (recherche de l'effet dose dans l'action du produit DSS) par binôme avec 10 animaux par lot (nombre nécessaire à l'exploitation des données statistiques).

Nous avons envisagé de ne prendre qu'une souris témoin pour 2 binômes (soit 4 étudiants) mais nous exploitons déjà toute la longueur du côlon de nos souris pour l'ensemble des prélèvements. Il nous manquerait donc du matériel vivant dans ce cas car les explorations biochimiques nécessitent des tissus inflammatoires frais et pas seulement du sang. En parallèle, l'intérêt de cette manipulation réside dans ces aspects pluridisciplinaires et permettent aux étudiants une réflexion transdisciplinaire. De plus, il existe une certaine variabilité, même au sein des animaux témoins.

Pour le raffinement, les souris sont stabulées dans des cages de 800 cm³, avec, à leur disposition, des tunnels carton ou plastique pour se cacher et jouer et du papier pour la fabrication du nid collectif elles sont 5 par cage.

Ces différents éléments contribuent à l'enrichissement social et matériel des animaux afin d'améliorer leur environnement.

Afin de veiller à leur bien-être, les souris sont surveillées quotidiennement par les étudiants et l'enseignant ou l'animalier pour noter des changements éventuels

- de comportement baisse d'activité, prostration.
- d'aspect du pelage perte de brillance, tenue ou piloérection
- de poids (mesuré par pesée quotidienne) en baisse.

La douleur imposée aux animaux lors de ce protocole est estimée avec un degré de gravité de niveau 2, correspondant à une contrainte légère et de longue durée.

Si l'animal présente des signes de prostration, qui limite son accès à la nourriture et à l'eau, ces derniers seront mis à disposition au niveau de la litière.

En cas de douleurs, les animaux seront traités avec un antalgique non AINS, tel que le paracétamol, qui sera administré en IP à la dose de 200 mg/kg/jour.

Si l'animal présente une perte de poids supérieure à 15%, le traitement au DSS est stoppé jusqu'à récupération de l'animal. Si son état de santé ne s'améliore pas, la souris est euthanasiée.

La finalité de ce projet est la réalisation d'une étude exploratoire pluridisciplinaire de l'inflammation à but pédagogique, permettant aux étudiants de mieux appréhender les relations structure/ fonction *in vivo* au sein de l'organisme d'un cas d'agression induite ici l'inflammation colique. Il n'existe pas de méthode alternative permettant de prendre en compte ce type d'interactions et il s'agit de l'unique étude, à partir d'un modèle animal, réalisée durant cette année de licence pro.

Cette étude permet aussi aux étudiants, au cours de plusieurs séries de Travaux pratiques (histologiques et biochimiques), de manipuler l'animal à l'animalerie, d'observer le comportement et d'évaluer l'impact du traitement sur les souris, de manipuler et d'acquérir les pratiques histologiques et biochimiques, ensemble de compétences requises en situation réelle dans le cadre de leur futur métier de technicien.

Cet enseignement pratique est très important dans la cadre de la formation de nos étudiants qui vont ensuite principalement travailler en recherche dans l'industrie pharmaceutique. La force de cette formation et de nos étudiants est leur capacité à s'adapter aux expérimentations *in vivo* durant leur stage et leur futur travail.

14910 Le but de ce projet est d'assurer, conformément aux exigences de la réglementation sur la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques, la formation du personnel aux techniques pratiquées par le laboratoire de recherche, et d'assurer la formation continue qui permet de maintenir à niveau les compétences de chacun.

La formation est réalisée sous la responsabilité du responsable de formation qui s'assure du respect des recommandations internationales publiées et du respect du bien-être et du confort des animaux.

Les espèces concernées sont des non rongeurs (chiens, porcs, furets) l'espèce utilisée et le type d'actes réalisés reflètent ceux qui sont effectués au cours de nos études. Le projet comporte 5

procédures les 3 premières procédures correspondent aux administrations de substances et aux prélèvements pour chacune des espèces (1 procédure par espèce), la 4^{ème} procédure correspond à une formation à la chirurgie sous anesthésie sans réveil, et la 5^{ème} procédure correspond à une formation à la chirurgie en prévoyant le réveil des animaux. Sont incluses dans les 3 premières procédures les formations à l'anesthésie et à l'euthanasie. Chaque technique est apprise séparément et un superviseur s'assure que chaque personne valide son apprentissage jusqu'à l'autonomie.

La démarche de remplacement est prévue en utilisant des documents et dans la mesure du possible des supports vidéos. Ce projet utilisant des animaux vivants reste nécessaire dans le but d'approfondir cette compétence technique et de former aux espèces et aux actes particuliers prévus dans les études en intégrant la prise en compte des réactions et comportement des animaux.

Pour assurer la formation d'environ 50 personnes pour les miniporcs/chiens et d'environ 10 personnes pour les furets, ce projet utilisera au maximum 40 miniporcs par an, 40 chiens par an et 10 furets par an (soit au maximum sur 5 ans 200 miniporcs, 200 chiens et 50 furets). Le nombre pour chaque espèce est ajusté au minimum nécessaire pour tenir compte des besoins d'acquérir une compétence technique validée, pour l'ensemble des techniques nécessaires, et à plusieurs âges des animaux. La démarche de réduction est prévue en optimisant le nombre d'animaux, tout en limitant cependant le nombre d'actes sur un même individu.

Dans la mesure du possible, les animaux utilisés sont issus d'un projet précédent et non commandés seulement pour la formation. Cependant, il est possible dans certains cas, en vue d'un projet spécifique, que les animaux utilisés soient commandés pour la formation.

Dans un souci de raffinement, toutes les techniques seront enseignées selon des méthodes recommandées et visées par la Structure de Bien-Etre Animal pour minimiser l'impact sur l'animal et avec une surveillance accrue des points limites. Les techniques pouvant engendrer du stress seront limitées au minimum, et une anesthésie (normalement pas nécessaire pour des gestes peu invasifs) pourra être envisagée en début d'apprentissage.

L'hébergement est conforme aux recommandations en vigueur. Les animaux disposent d'un programme d'enrichissement avec un aménagement de leur environnement. Notre standard est de socialiser les animaux (sauf exceptions miniporcs mâles, animaux en post-chirurgie en fonction de l'intervention pratiquée et si nous disposons d'un seul animal par sexe). Les techniques pouvant engendrer du stress seront limitées au minimum. En post-chirurgie, les animaux seront ou non socialisés selon le type d'intervention réalisée. De plus, pour éviter les bagarres, les miniporcs mâles sont maintenus isolés. Dans le cas d'isolement, les animaux restent en contact visuel, auditif et olfactif avec des congénères et ont accès à un enrichissement de l'environnement.

14911 Si les 4 phases du cycle du Campagnol terrestre (*Arvicola terrestris*) sont clairement identifiées (Basse densité, croissance, pic de pullulation, déclin), il subsiste néanmoins des zones d'ombre relatives à la compréhension du cycle, notamment concernant les déterminants de la phase de déclin des populations. La mise en place d'un programme de recherche fondamentale sur la compréhension de cette phase permettra aux éleveurs en AOC Comté d'adapter leurs stratégies de régénération de prairies, de mieux appréhender l'impact du déclin sur les exploitations agricoles et d'anticiper sur la lutte raisonnée.

Ce projet d'une durée de 5 ans s'attachera à appréhender la sénescence des populations par l'examen de l'évolution du cortège de pathogènes et de la compétence immunitaire des campagnols terrestres.

Les mammifères étudiés sont des rongeurs (Campagnols terrestres).

Cinq Sites d'étude seront suivis sur le département du Doubs et du Jura qui présentent des fluctuations pluriannuelles avec des densités de campagnols terrestres allant de quelques individus à l'hectare en phase de basse densité à plusieurs centaines de rongeurs par hectare au plus fort de la pullulation. Ces sites sont situés dans la Zone Atelier Arc Jurassien localisée en Franche-Comté.

Sur les 5 sites d'étude, à raison de 2 prélèvements par an, et de 30 individus par site, les effectifs annuels souhaités sont de 300 animaux. L'ensemble des animaux seront euthanasiés par dislocation cervicale afin d'analyser les pathogènes présents dans la totalité des organes.

Les animaux seront capturés à l'aide de pièges non létaux relevés au moins 2 fois par jour. Les animaux seront euthanasiés dans l'heure qui suit le prélèvement. En ce qui concerne les exigences de remplacement, aucune technique non létale, *in vitro* ou de modélisation ne permet, à l'heure actuelle et à notre connaissance, de répondre aux objectifs scientifiques du présent programme. Les effectifs souhaités tiennent compte de la règle de la réduction, d'impératifs techniques (Il est indispensable de disposer d'un prélèvement sanguin et de l'ensemble des organes - estomac, intestin, reins, foie, rate, cœur et poumons en vue d'analyser la diversité des pathogènes présents) et d'impératifs statistiques. Un minimum de 30 individus est en effet nécessaire pour assurer à la fois la représentativité de la diversité des communautés parasitaires hébergées par les individus et une puissance statistique adéquate pour montrer des différences dans les assemblages des communautés parasitaires entre sites et entre années. En termes de raffinement, les captures et manipulations sont effectuées en silence et aussi rapidement que possible, par du personnel expérimenté, en maintenant les animaux dans les pièges et/ou dans des cages à l'obscurité autant que possible, afin de diminuer au maximum le stress de la capture.

14912 L'appétence d'un produit désigne l'attraction naturelle et instinctive pour un aliment. La satiété désigne, quant à elle, l'état de rassasiement.

Un aliment nutritionnellement parfait n'a pas de raison d'être si l'animal refuse de le consommer en quantité suffisante. L'appétence d'un produit est donc un critère de sélection primordial dans le comportement alimentaire. A contrario, un aliment peu satiétogène peut favoriser une consommation à l'excès induisant l'apparition de problèmes de santé tels que le surpoids. Un produit alimentaire pour chat et chien doit donc être suffisamment satiétogène.

Pour développer des aliments pour chat et chien à la fois appétents et satiétogènes, il faut réaliser des évaluations d'appétence et de satiété. Ces études permettent d'identifier puis d'améliorer et d'adapter les facteurs qui impactent sur l'appétence et l'effet satiétogène d'un produit composition nutritionnelle, choix des ingrédients, packaging, etc.

La réalisation de ces évaluations impliquera un maximum de 168 chiens et 212 chats sur l'ensemble du projet.

Ce projet d'étude a été conçu de manière à respecter la législation française et européenne en vigueur pour l'expérimentation animale et répond aux impératifs des 3R. La partie substitution (Remplacement) n'est pas envisageable sur ce projet puisque les échantillons doivent être réalisées sur les espèces cibles (chats et chiens). La partie réduction (Reduction) a été prise en compte par des analyses de puissance statistique fixant les minimums d'animaux requis pour détecter les écarts ayant un sens biologique. De plus, L'utilisation de chien et chat spécifiquement entraînés et faisant l'objet d'un suivi très régulier permet de réduire significativement le nombre d'individu nécessaire. Enfin, la partie raffinement (Refinement) est prise en compte par la socialisation de nos chiens et chats dès leur plus jeune âge afin qu'ils soient totalement accoutumés à l'environnement et aux manipulations liées à ce projet.

14913 La compréhension de la nutrition chez le chat et le chien nécessite de savoir comment les aliments sont digérés et excrétés (selles et urines étant les produits terminaux, après absorption puis digestion d'un aliment). Pour cela, dès que ces animaux urinent et défèquent, leurs urines et leurs selles sont collectées et analysées, afin de connaître l'impact de l'alimentation sur la santé urinaire et sur la digestion.

Ainsi, l'analyse des selles et des urines fournit des informations importantes sur les capacités digestives et urinaires des chats et des chiens. Ces résultats permettent d'apporter les réponses nutritionnelles les plus adaptées à leurs besoins.

L'analyse des selles (qualité, composition) renseigne sur la digestibilité d'un aliment, la proportion de nutriments utilisés par l'animal et le lien entre ses capacités digestives et la composition de

l'aliment. Différents paramètres peuvent être mesurés teneur en eau, consistance, odeur, volume, couleur, pourcentage de digestibilité des nutriments.

L'analyse des urines (composition) renseigne sur la quantité d'eau provenant de l'aliment et celle ingérée, mais également sur la composition de l'aliment. Différents paramètres peuvent être mesurés concentration minérale, densité urinaire, couleur, odeur, pH, nature et quantité des métabolites excrétés, risque de formation de calculs.

La réalisation de ces évaluations impliquera un maximum de 108 chiens et 108 chats sur l'ensemble du projet.

Ce projet d'étude a été conçu de manière à respecter la législation française et européenne en vigueur pour l'expérimentation animale et répond aux impératifs des 3R. La partie substitution (Replacement) n'est pas envisageable sur ce projet puisque les échantillons doivent être réalisées sur les espèces cibles (chats et chiens). La partie réduction (Reduction) a été prise en compte par des analyses de puissance statistique fixant les minimums d'animaux requis pour détecter les écarts ayant un sens biologique. De plus, L'utilisation de chien et chat spécifiquement entraînés et faisant l'objet d'un suivi très régulier permet de réduire significativement le nombre d'individu nécessaire. Enfin, la partie raffinement (Refinement) est prise en compte par la socialisation de nos chiens et chats dès leur plus jeune âge afin qu'ils soient totalement accoutumés à l'environnement aux manipulations liées aux prélèvements biologiques de ce projet.

14914 Avant la 1ère administration d'un nouveau candidat-médicament chez l'Homme, des études de pharmacologie de sécurité, recommandées par différentes directives internationales (ICH S7A et S7B et ICH M3(R2)) permettent préalablement d'évaluer la présence ou non d'effets secondaires de toute nouvelle molécule sur les grandes fonctions vitales (cardiovasculaire, respiratoire et système nerveux central). Les résultats obtenus déterminant le rapport bénéfice/risque et expliquant les effets observés, sont essentiels pour assurer la sécurité des patients.

Ces études sont réalisées tout au long des phases de développement d'un produit du stade précoce (phase de recherche amont) au stade plus tardif (phase préclinique du développement) afin de sélectionner in fine un candidat-médicament.

Au stade précoce de la recherche d'efficacité et de sélectivité sur la cible thérapeutique, ces investigations permettent d'alerter rapidement sur d'éventuels effets indésirables en fournissant des informations cruciales

- aux chimistes pour la synthèse d'autres structures chimiques présentant moins d'effets secondaires,
- aux biologistes pour l'optimisation, si nécessaire, des modèles expérimentaux prenant en compte ces potentielles alertes.

Dans le cadre de ce projet, seules les fonctions cardiovasculaires et respiratoires sont présentées. Plusieurs types de protocoles expérimentaux peuvent être conduits

- Des procédures sur animaux vigiles et libres de tout mouvement pour évaluer les paramètres cardiovasculaires et/ou respiratoires (télémétrie et pléthysmographie, technologies répondant aux critères de raffinement et de réduction)
- Des approches non chirurgicales sur des animaux vigiles en contention pour évaluer les paramètres cardiovasculaires (échographie, cardiométrie et oscillométrie technologies répondant aux critères de raffinement et de réduction).
- Des procédures sur animaux anesthésiés pour approfondir les mécanismes d'action des molécules testées.

Les études réalisées au sein du centre de recherche sont encadrées par des recommandations internes, intégrant tous les aspects affectant l'utilisation des animaux (hébergement, soins, manipulation, expérimentations...), ayant pour objectif de prévenir toute douleur ou détresse chez l'animal et d'appliquer, si possible, la règle des « 3R » raffinement, remplacement et réduction. Il est à noter que l'utilisation du primate non humain dans les expérimentations n'est jamais considérée en première intention sauf raison scientifique argumentée.

Après obtention d'un nombre suffisant de données scientifiques par expérimentation, une analyse statistique est réalisée par des biostatisticiens, afin d'optimiser les méthodes expérimentales employées et de réduire le nombre d'animaux utilisés.

Les expérimentateurs sont formés et habilités aux gestes techniques impliquant l'utilisation des animaux et à l'observation des signes cliniques relatifs au bien-être de l'animal tout au long de son existence.

Ce projet couvre l'utilisation maximale pour 1 an de 16 primates non humains, 40 chiens, 160 cobayes, 190 rats et 100 souris correspondant à un total maximal de 506 animaux.

14915 Le système nerveux des mammifères est constitué du système nerveux central, le cerveau et la moelle épinière, et du système nerveux périphérique (SNP), les nerfs qui parcourent le corps. Le SNP est essentiel pour distribuer aux muscles et aux différents organes les informations transmises par le cerveau mais aussi pour faire remonter les informations sensorielles collectées par les organes des sens. Le SNP est composé de deux types cellulaires principaux, les axones de neurones périphériques moteurs et sensitifs et les cellules de Schwann, les cellules gliales du SNP. Les cellules de Schwann entourent et forment une gaine isolante, protectrice et nutritive autour des axones, la gaine de myéline. La plupart des maladies de ce système sont dues à des problèmes dans la maintenance des interactions cellulaires étroites qui existent entre les axones et la myéline. Les neuropathies du nerf peuvent provenir de défauts de l'axone ou de la myéline. Elles sont d'origines génétiques, les maladies de Charcot-Marie-Tooth (CMT), les plus communes de maladies rares, ou bien acquises, comme la neuropathie diabétique ou le syndrome de Guillain-Barré. Toutes ensemble ces maladies du nerf représentent un nombre considérable de malades en France et dans le monde. A l'heure actuelle il n'existe aucune thérapie spécifique pour ces maladies. L'étude du SNP est compliquée par l'existence de relations très étroites entre les cellules gliales et les axones et étudier le système dans des modèles expérimentaux qui n'incluent pas ces interactions n'a pas vraiment d'intérêt. Or ces interactions sont difficiles à reproduire *in vitro*. Il existe un système de délicates co-cultures avec des cellules de Schwann et de neurones qui permet d'obtenir de la myéline. Mais malheureusement cette myéline reste incomplète et immature ce qui empêche d'analyser ce qu'il se passe lors des maladies de la maintenance de la myéline. Il n'existe donc pas à l'heure actuelle d'alternative à l'étude du système dans l'animal. Notre laboratoire a acquis une solide expertise dans la biologie du nerf périphérique et dans les maladies du nerf. Ce projet est destiné à poursuivre notre étude des mécanismes moléculaires qui sont mis en jeu dans la mise en place des structures nerveuses et surtout dans leur maintenance. Il est aussi destiné à développer des approches de thérapie génique et pharmacologique pour le traitement des maladies du nerf et à faire des tests précliniques chez le petit rongeur.

Plus spécifiquement nous décrivons une méthode de transgénèse virale des neurones de la moelle épinière qui projettent leurs axones dans les nerfs (procédure 1). Au-delà de la réduction du nombre d'animaux par rapport à la méthode de modification génétique, la transgénèse virale permet de remplacer et de raffiner l'approche transgénétique car 1- elle est très spécifique on cible et on analyse uniquement les cellules du nerf qui nous intéressent et 2- elle atteint relativement peu de cellules dans le nerf (10 à 20% des cellules cibles). Tout effet systémique nocif ou douloureux résultant de la transgénèse génétique totale est ainsi évité. Nous décrivons aussi une méthode de stimulation électrique du nerf saphène (procédure 4), et une méthode d'étude de la démyélinisation par écrasement du nerf sous anesthésie générale (procédure 5). De plus nous décrivons plusieurs méthodes d'exploration fonctionnelle des fonctions motrices et nerveuses de souris et de rats (procédures 2 et 3). Au total il s'agira de 1020 souris et 400 rats.

Grace à ces expériences nous élucidons certains mécanismes cellulaires impliqués dans la maintenance des gaines de myéline dans les nerfs et valider des approches de thérapies géniques et pharmacologiques pour les maladies du nerf chez l'animal. Ceci nous permettra un jour de proposer de telles thérapies pour des essais cliniques chez l'homme.

14916 Environ 750 000 personnes épileptiques sont suivies en France et on estime que 5 % de la population est susceptible de déclencher une crise. Mieux comprendre l'origine et la progression de

cette pathologie passe aussi par la caractérisation et l'utilisation de modèles animaux mimant au mieux la pathologie, et à exploiter ces mêmes modèles pour valider de nouveaux traitements. Nos travaux visent à caractériser le rôle de l'inflammation, en particulier des tissus périphériques, dans l'épilepsie. En effet, des données cliniques ainsi que des données récentes issues de la recherche fondamentale suggèrent un rôle pathologique de l'inflammation sur l'épilepsie, au travers d'interactions entre cerveau et organes périphériques au cours des crises. Dans ce contexte, les données obtenues chez l'homme ne permettent pas à elles seules de caractériser précisément les changements observés au niveau inflammatoire, au cours de la mise en place des crises puis de leur récurrence. C'est dans ce contexte du suivi du statut inflammatoire que s'inscrit ce projet. Nous travaillerons sur un modèle murin d'épilepsie induite par une injection i.p. de kainate. A l'image de la pathologie humaine, ce modèle déclenche une première crise mimant l'initiation de la pathologie, suivie de crises récurrentes spontanées. Nous étudierons les réponses inflammatoires des animaux au cours des crises, dans le tissu cérébral et dans différents organes périphériques connus pour être impliqués dans les processus inflammatoires (rate, glandes surrénales, moelle osseuse). Des échantillons sanguins seront aussi collectés. Nous caractériserons les changements de cytokines pro-inflammatoires, de taux d'hormones, des leucocytes dans les tissus et dans le sang et des enzymes impliquées dans la régulation du métabolisme et du stress, connues pour être augmentées durant les crises. Bien qu'étant menés uniquement chez l'animal, nos travaux s'inscrivent néanmoins dans un contexte de recherche translationnelle et sont susceptibles de trouver des applications cliniques ciblant des médiateurs de l'inflammation.

En pratique, cette étude utilisera 340 souris réparties en 8 groupes de 30 à 50 animaux, selon qu'il s'agisse de groupes contrôles ou traitées. Ces calculs prennent en considération le taux de mortalité inhérent à la procédure d'induction de l'épilepsie ainsi que le nombre d'animaux qui ne développeront pas de crises récurrentes. Satisfaisant aux 3R, nous avons effectué une recherche bibliographique afin d'identifier de possibles approches alternatives *in vitro*. Ces méthodes, basées sur la culture cellulaire, sont, pour cette étude, inappropriées car elles ne conservent pas les systèmes de communication multicellulaires. Le nombre d'animaux sera réduit grâce à une approche rationnelle, associant des prélèvements réalisés de façon optimale (plusieurs tissus prélevés sur un même animal et utilisation des mêmes animaux par les différentes équipes), et un nombre d'animaux par lot approprié pour des analyses statistiques fiables. Une médication analgésique et anti-inflammatoire sera mise en œuvre pour réduire la douleur. Egalement, une habituation des animaux à leur environnement ainsi qu'un hébergement en cage enrichie contribuera à leur bien-être. Ces mesures de raffinement permettront de diminuer les états de stress, d'augmenter la reproductibilité des résultats et par conséquent contribueront à réduire le nombre d'animaux.

14917 Les épidémies saisonnières de grippe sont responsables chaque année de 500 000 à 650 000 décès au niveau mondial. Ces pandémies grippales surviennent de façon irrégulière et imprévisible, avec des conséquences pouvant être catastrophiques. Selon un récent rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), ce risque de pandémie de grippe fait partie des 10 principales menaces pour la santé humaine, ce qui place la grippe sur la liste des maladies pour lesquelles un effort urgent de recherche et développement est jugé indispensable. Actuellement, des antiviraux sont disponibles, cependant, une résistance substantielle à ces médicaments s'est développée pour deux des quatre médicaments antiviraux actuellement sur le marché. C'est pourquoi aujourd'hui de nouvelles molécules thérapeutiques sont recherchées.

Dans ce contexte, une famille de 3 molécules chimiques ayant la capacité d'inhiber fortement la réplication du virus de la grippe a été identifié et caractérisé (*in vitro*). Dans les différentes lignées cellulaires testées, ces molécules sont non-cytotoxiques aux concentrations actives et, dans les mêmes conditions, n'ont aucun effet sur la réplication d'un autre virus (VSV), ce qui démontre une certaine spécificité.

L'objectif de ce projet est de valider, chez la souris, le meilleur candidat-médicament identifié (parmi 3 candidats potentiels). Les données préliminaires obtenues au laboratoire sur l'inhibition du virus de la grippe sont extrêmement prometteuses. De plus, de façon très intéressante, ce candidat-

médicament a déjà fait l'objet d'essais cliniques de phase II et III, comme traitement anticancéreux. Son innocuité chez l'homme et chez l'animal a donc déjà été démontré.

Aujourd'hui, il est nécessaire de poursuivre la caractérisation de cette molécule candidate en évaluant son efficacité contre le virus de la grippe *in vivo*, chez la souris. En effet, dans la perspective de développements cliniques de ce candidat-médicament, des tests *in vivo* restent indispensables. Les modèles *in vitro* et *ex vivo* ne pouvant pas remplacer la complexité d'un organisme complet.

Dans le cadre de projet, deux types de procédures ont été prévues une première procédure visera à déterminer la dose de composé la plus adaptée permettant d'observer un effet antiviral. La seconde procédure est un test de protection l'effet de la molécule candidate sera comparé à celui de la molécule de référence actuellement commercialisé et administré contre la grippe. Le risque d'une nouvelle pandémie sévère est réel. Les résultats obtenus au cours de ce projet auront pour but d'une part, de proposer une nouvelle utilisation de cette molécule comme candidat-médicament contre les virus influenza (repositionnement de médicament) et d'autre part de comprendre les réponses immunitaires induites, afin de mieux traiter les patients atteints de la grippe.

Le choix du modèle souris est imposé par son utilisation dans les tests précliniques des compagnies pharmaceutiques. De plus, la réponse immunitaire contre un pathogène est un phénomène biologique complexe et dynamique, faisant intervenir de multiples types cellulaires et une organisation spatiale qui rend impossible son étude dans des tests *in vitro*.

Ce projet se veut en conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement (3R) Pour les différentes procédures, le nombre d'animaux utilisés est réduit au minimum nécessaire à l'interprétation statistique des résultats. Les souris seront sous anesthésie profonde afin de réaliser les infections par le virus de la grippe et les animaux seront observés tous les jours durant toute la procédure. 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 que pourraient ressentir les animaux.

L'ensemble de ce projet nécessitera l'utilisation de 220 souris au maximum.

14918 Les pratiques médicales modernes impliquent un nombre croissant de dispositifs médicaux implantés. L'infection bactérienne représente une des plus sérieuses et communes complications de ces appareils avec un taux d'infection allant de 2 à 40% selon le type d'implant chirurgical et reste un obstacle majeur à ces opérations. Elle implique des bactéries pathogènes telles que le *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* et est particulièrement difficile à traiter requérant de longues périodes de traitement antibiotique et la répétition d'actes chirurgicaux parfois insuffisants résultant en un taux de morbidité et mortalité élevée. En cause, le mode de développement des bactéries sous forme de biofilms engendre des phénomènes de résistance et de tolérance face aux antibiotiques et au système immunitaire, menant à des infections chroniques.

Dans le but de combattre les infections associées aux biofilms, de nouvelles approches thérapeutiques sont en développement. Parmi elles, l'utilisation de systèmes de délivrance de principes actifs se positionnent comme un traitement prometteur. En effet, ces systèmes de moins de 1 micromètre de diamètre et transportant un antibiotique sont capables de pénétrer la matrice d'un biofilm à des concentrations élevées et diffuser sur des périodes de temps prolongées afin d'atteindre les bactéries les plus en profondeur. L'émergence de nouvelles classes thérapeutiques a également vu le jour ces dernières années. Ainsi, les agents antibiofilms, molécules capables de s'attaquer à la structure d'un biofilm, font l'objet de combinaisons thérapeutiques pour lutter efficacement contre un biofilm.

L'objectif de ce projet est de développer une thérapie combinatoire à base de vecteurs synthétiques multi-fonctionnalisés afin d'éradiquer efficacement des biofilms bactériens de *S. aureus* et de *E. coli* développés sur un implant chirurgical *in situ*. Les 3R ont été considérés à travers cette démarche. Pour cela, en terme de Remplacement, des formulations reproductibles et stables ont déjà prouvé leur efficacité sur des biofilms bactériens *in vitro* et leur non toxicité sur cellules de mammifères, permettant d'envisager un développement clinique et industriel prometteur. Il est nécessaire

d'évaluer leur efficacité *in vivo* puisqu'aucune méthode alternative ne peut se substituer à l'utilisation d'animaux avant d'envisager l'utilisation des formulations développées chez l'Homme. Concernant la Réduction, un unique modèle d'infection sur implant sera alors développé pour les deux bactéries modèles indépendamment. Le nombre de souris nécessaires aux expérimentations a été réduit autant que possible sans compromettre l'interprétation statistique des résultats. 1626 souris sont prévues sur une période de 5 ans, permettant de mettre en évidence l'efficacité des formulations développées et combinées par rapport au traitement non formulé. Enfin, pour le Raffinement, une définition précise des points limites, une surveillance continue des animaux par un personnel compétent ainsi que la mise en place de protocoles adaptés d'anesthésie-analgésie permettront de limiter au maximum toute souffrance animale.

14919 Le cancer épithélial de l'ovaire, qui représente plus de 95 % des cancers de l'ovaire, reste de très mauvais pronostic (survie à 5 ans inférieure à 35 %). L'absence de signes cliniques aux premiers stades de la maladie est un des problèmes majeurs de ce cancer car les patientes sont très fréquemment diagnostiquées à un stade avancé de la maladie. Le traitement standard repose sur une chirurgie permettant d'enlever la tumeur primaire (ovariectomie) et les nodules ayant pu s'implanter dans le péritoine, associée à une chimiothérapie. Malgré ce traitement, la quasi-totalité des cancers de l'ovaire rechute. Cela est associé à une résistance aux produits de chimiothérapie et au développement d'une carcinose péritonéale (c'est-à-dire un envahissement du péritoine par des tumeurs malignes secondaires).

Dans ce contexte de nouveaux traitements thérapeutiques sont évalués.

Ainsi, le présent projet consiste à évaluer les effets anti-tumoraux de différentes approches thérapeutiques (chimiothérapie, immunothérapie, radiothérapie - associées ou non à une ablation chirurgicale de la tumeur) dans des modèles expérimentaux de cancers de l'ovaire chez la souris induite par l'inoculation de cellules tumorales soit par voie sous-cutanée, soit par voie intrapéritonéale, soit par implantation directe au niveau de l'ovaire (suivie ou non de l'ovariectomie).

Après implantation des cellules, les souris seront suivies cliniquement pendant une période variable, allant de quelques semaines à plusieurs mois, en fonction de la cinétique de croissance tumorale *in vivo* des cellules implantées et de l'apparition des signes cliniques associés à la tumeur.

Selon les cas, un suivi longitudinal et non-invasif de la croissance tumorale pourra être réalisé par l'utilisation des techniques d'imagerie optique comme la bioluminescence et la fluorescence *in vivo*, ou l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM).

En cours de suivi, des prélèvements de sang pourront être réalisés pour l'évaluation de biomarqueurs.

Les animaux seront suivis quotidiennement. Dès l'apparition de signes décrits dans les points limites définis les souris seront euthanasiées.

Pour ce projet, il est prévu un nombre maximal de 800 animaux sur 5 ans.

La conception de ce projet prend en compte la règle des 3R.

Remplacement dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez la souris car il n'existe pas de méthode de substitution (*in vitro* ou *in silico*) pour évaluer les effets d'une nouvelle approche thérapeutique pour ces tumeurs. Or, avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité, de la toxicité et de la pharmacocinétique d'un candidat médicament. À ce jour, la souris est l'espèce la plus adaptée à ce type de modèle d'étude.

Réduction Un nombre minimal et suffisant d'animaux par groupe est utilisé afin d'exploiter de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et d'effectuer des analyses statistiques.

Raffinement dans ce projet, le raffinement est obtenu par

- la mise au point de procédures rigoureuses
- un protocole analgésique adapté pour la chirurgie et la période post-opératoire et un suivi post-opératoire de l'état de santé des animaux avec des soins et un enrichissement adapté afin de permettre une bonne récupération des animaux

- le recours à des procédures les moins invasives et moins douloureuses possibles (par exemple l'imagerie)
- un suivi clinique étroit des animaux pendant la phase de croissance des tumeurs et après
- la mise en place de points limites adaptés et le suivi d'éventuels signes cliniques
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.

14920 Les individus dépendants de la nicotine deviennent également hypersensibles aux stimuli sensoriels associés à sa consommation, comme par exemple le contexte spatial et temporel, l'odeur de fumée ou encore le goût, car ceux-ci présentent une valeur hédonique (plaisir associé à la consommation) positive à force d'associations. Les fumeurs sont très souvent attachés à « leur » marque de cigarette. L'importance de ces entrées sensorielles dans les effets addictifs de la nicotine est particulièrement soulignée dans le contexte récent avec l'explosion du vapotage, le développement des E-cigarettes et e-liquides avec de multiples arômes développés pour rendre le produit attrayant et spécifique. Néanmoins, les études précliniques qui s'intéressent à caractériser le développement potentiel d'une addiction au vapotage sont quasiment inexistantes du fait du manque de modèle animal. Tout comme les conséquences pulmonaires d'une exposition au vapotage sont méconnues. C'est donc dans ce contexte que nous développons un projet qui a pour objectif scientifique de modéliser chez le rongeur l'exposition à la E-cigarette. Il s'agira d'examiner les aspects motivationnels et hédoniques en réponse à la vaporisation de nicotine avec ou sans arôme afin de tester le potentiel addictif de ces nouveaux composés inhalés.

Ce projet implique au total 170 souris, et nous mettons tout en œuvre pour respecter au mieux le bien-être animal et le principe des 3R. Le modèle animal ne pouvant être remplacé, dans cette étude, par d'autres méthodes alternatives n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants, l'effectif des animaux a été réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiques, et nous avons raffiné nos procédures tout en tenant compte des variations interindividuelles et du pourcentage de perte lors des chirurgies. Les animaux sont hébergés dans des animaleries thermorégulées et disposent d'un milieu enrichi selon les normes dictées par les Directives Européennes. Les animaux sont manipulés régulièrement afin d'inhiber tout stress et sont observés quotidiennement afin de réagir au plus vite en cas d'apparition de signes de souffrance. Etant particulièrement vigilants à la prise en charge de la douleur, nous avons mis en place des points limites spécifiques et précoces, ainsi que des mesures prophylactiques et analgésiques adaptées.

14921 L'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) joue un grand rôle dans le diagnostic médical depuis 1988 et continue d'être une technique d'imagerie très utilisée pour ses nombreux avantages. L'utilisation d'agents de contraste est parfois importante l'augmentation du contraste peut permettre d'identifier des pathologies qui n'auraient pas été vue sur l'image. Ils sont donc un outil indispensable pour le médecin radiologue. Depuis 1999, plus de 50 tonnes de Gadolinium (Gd) ont été administré annuellement à des patients dans le monde entier. Le développement de l'IRM et des agents de contrastes IRM est en hausse avec plus de 40 millions d'administrations d'agent au Gadolinium dans le monde.

Ces agents présentent des inconvénients parmi lesquels sont

- La toxicité des molécules principalement due à l'atome de Gd
- L'absence de spécificité vis-à-vis d'un tissu d'intérêt
- Le manque de solution technique les impliquant afin de rendre l'IRM une modalité d'imagerie moléculaire.

De nouveaux agents (appelés sondes moléculaires) capables de détecter ou de quantifier des biomarqueurs pathologiques pourraient révolutionner la manière dont l'IRM est utilisée pour détecter, caractériser et quantifier les tissus malades. Notre équipe développe depuis plusieurs années une alternative moléculaire aux agents de contraste couramment employés dans les hôpitaux de nos jours des sondes à base de fer, moins toxiques, et révélateur d'une activité enzymatique biomarqueur.

Le projet qui fait l'objet la présente demande, d'une durée de deux ans, consistera à étudier au cours d'une seule procédure, le comportement et la capacité d'imagerie des molécules utilisées dans un contexte vivant. Un maximum de 81 rats ou souris sera utilisé, la procédure, de classe de sévérité légère, consistera à l'administration de ces sondes puis à l'acquisition de ces animaux en IRM. L'ingestion orale de ces sondes moléculaires ne devraient pas engendrer d'effets néfastes sur les animaux. Cette demande constituera la preuve de concept *in vivo* et permettra d'obtenir des données cruciales pour le bon développement de celles-ci vers une utilisation humaine mais aussi de définir des facteurs expérimentaux nécessaires à un futur projet plus conséquent et ambitieux.

Application des 3Rs

Remplacement Ce projet à la frontière entre la recherche fondamentale (de par la totale nouveauté des concepts moléculaires développés) et la recherche appliquée (valorisée par un brevet) a permis la réalisation d'une preuve de concept *in vitro*. Dans une optique de développement du concept moléculaire vers un agent d'imagerie IRM spécifique à destination de l'humain, effectuer des tests de biocompatibilité, d'activité et de cinétique *in vivo* de molécules sur petit animal (rats) est une étape nécessaire et décisive du projet.

Réduction Le nombre d'animaux prévu (81) correspond au nombre maximal nécessaire, les données seront analysées au fur et à mesure permettant d'arrêter le protocole dès que les résultats attendus seront obtenus.

Raffinement : Les animaux inscrits dans ce projet subiront une procédure légère avec un temps d'anesthésie inférieur à deux heures. Notre attention sera portée sur le raffinement de la procédure, contrôle de la mise à jeun, ingestion orale des sondes moléculaires d'intérêt, anesthésie volatile.

14922 L'excès des émissions liées aux activités humaines de dioxyde de carbone (CO₂) dans l'atmosphère est absorbé par l'eau des mers et des océans. Cette absorption massive de CO₂ entraîne une diminution du pH et une augmentation de la température moyenne des eaux superficielles. La capacité des organismes marins à faire face au réchauffement climatique et à l'acidification des océans dans les zones côtières, particulièrement touchées par le changement global, détermine la survie et le recrutement de nombreux poissons marins de haute valeur commerciale. Il est reconnu que la plage de tolérance des poissons face à ces stress environnementaux repose notamment sur leur capacité à réguler plusieurs processus physiologiques (plasticité phénotypique) dont le métabolisme énergétique, la fonction respiratoire et cardiovasculaire et l'équilibre acido-basique. Notre projet a pour but d'étudier l'impact de l'acidification des océans sur l'état de santé du bar commun et plus spécifiquement ses capacités de défense face au virus responsable de la nodavirus, lorsqu'il évolue dans une eau de mer à un pH de 7,6 prévu en 2100 au lieu de 8 actuellement. Pour ce faire, une procédure expérimentale sera menée dans le respect de la règle des 3R, à savoir, prioritairement, la réduction du nombre d'animaux utilisés au seuil de la pertinence scientifique et statistique. Au total, 320 poissons seront utilisés et parmi eux, 240 bars juvéniles seront infectés par un nodavirus. Des prélèvements de sang chez les poissons survivants de l'épreuve infectieuse permettront d'obtenir une caractérisation complète des réponses immunitaires mises en place par les poissons. Des mesures de raffinement viseront également à assurer des conditions optimales d'hébergement des animaux volume d'eau adapté avec une oxygénation suffisante, rythme jour/nuit naturel, présence de suffisamment de congénères pour exprimer un répertoire comportemental riche, une alimentation adaptée à leur stade de vie mais également d'appliquer des mesures pour réduire la douleur des individus pendant la procédure expérimentale. En ce qui concerne le remplacement, il n'est pas envisageable puisqu'aucune méthode alternative n'a encore été développée pour réaliser ce type de travaux.

14923 Dans les élevages de poulet de chair standard, les coccidies, peuvent être responsables de troubles sanitaires graves chez les animaux et de pertes économiques majeures. Elles sont principalement maîtrisées par l'emploi de coccidiostatiques. Ces molécules pourraient être menacées d'interdiction par le règlement CE 1831/2003. De plus, le risque de résistance des coccidies à ces coccidiostatiques est croissant. Enfin, la demande sociétale est forte pour réduire les intrants

chimiques en élevage. Ces éléments imposent de chercher des solutions complémentaires aux coccidiostatiques pour gérer ce risque coccidien.

Depuis une dizaine d'années, des données ont souligné les potentialités offertes par des ressources riches en métabolites secondaires.

Dans ce contexte, le but de ce projet est de tester l'efficacité d'alternatives aux coccidiostatiques classiques à base de plantes chez des poulets de chair élevés au sol infestés expérimentalement par deux espèces de coccidies une espèce caecale (*Eimeria tenella*) et une intestinale (*E. acervulina*). Ce projet est intégré dans une thèse CIFRE visant à comprendre le mécanisme d'action des plantes et les sélectionner *in vitro*, ainsi que préciser l'immunologie de l'infestation par *E. tenella*. En pratique, 30 720 poulets de chair de souche Ross 308 seront utilisés pour ce projet (2 essais par an pendant les 5 années du projet).

Ce projet est en adéquation avec la règle des 3R, à savoir

- le Remplacement des modèles animaux (en effet, la première partie du projet consiste à tester sur des populations d'*E. tenella* des additifs. Seuls ceux efficaces après ces premiers tests seront testés *in vivo*, afin d'observer leur appétence et leur effet sur l'immunité des animaux)
- la Réduction du nombre d'animaux en expérimentation (l'utilisation d'animaux homogènes sur les plans biologiques et sanitaire, afin de réduire autant que faire se peut la variabilité d'un individu à l'autre). Le nombre d'animaux choisi (512 animaux par lot) a été choisi selon une répartition complète des cases, dans une utilisation commerciale classique. Ce nombre a également été validé par un t-test et permettra une interprétation statistique des résultats, compte-tenu de l'écart-type important attendu (ANOVA à un facteur le lot) sur les mesures réalisées tout au long de l'essai
- le Raffinement (notamment par le choix du modèle animal le plus pertinent et le plus connu de notre société et la mise en place de points limites, de critères d'interruption).

14924 Chaque année, environ 14 millions de cancers sont diagnostiqués à travers le monde, responsables de plus de 8 millions de décès. Les approches pour le traitement du cancer ont profondément évolué ces dernières années et l'immuno-oncologie représente aujourd'hui une approche thérapeutique prometteuse dans ce domaine. Sa particularité n'est pas de cibler directement la tumeur comme les autres stratégies thérapeutiques mais d'aider le système immunitaire à reconnaître et détruire les cellules tumorales.

Parmi les différentes stratégies explorées en immuno-oncologie, les anticorps bi-spécifiques présentent un mode d'action intéressant. D'une part, ils lient les cellules tumorales et d'autre part, ils engagent les cellules effectrices de l'immunité, favorisant la mise en place d'une synapse cytolytique et ainsi l'élimination des cellules tumorales par les cellules immunitaires.

Le blinatumomab, un médicament aujourd'hui utilisé dans le traitement de la leucémie aiguë lymphoblastique (LAL), en est un exemple. Il s'agit d'un anticorps bi-spécifique engageant les lymphocytes T. Il se lie sélectivement au CD3 exprimé à la surface des lymphocytes T et au CD19 exprimé à la surface des cellules B malignes. Il active ainsi les lymphocytes T qui relarguent leurs enzymes protéolytiques. Toutefois, l'engagement des cellules T avec ce type de molécules montre des effets secondaires indésirables, notamment une toxicité apparente liée au relargage de certaines molécules (cytokines) propres aux cellules T.

Notre laboratoire, fort de son expertise sur les cellules NK, travaille actuellement sur le développement d'anticorps thérapeutiques équivalents, engageant non pas les lymphocytes T mais les cellules NK, cellules clés de l'immunité anti-tumorale. Les Bi-Specific NK Cell Engager (BS NKCE) se lient sélectivement à NKp46, un récepteur activateur, exprimé à la surface des cellules NK et à un antigène à la surface des cellules tumorales. Après sélection des meilleurs BS NKCE dans des tests fonctionnels *in vitro*, des tests seront effectués dans des modèles animaux aussi prédictifs que possible.

Le projet s'articulera en plusieurs étapes

-une première étape servira à évaluer les paramètres de pharmacocinétique et de pharmacodynamie des BS NKCE dans le sang périphérique des animaux. Le but est d'optimiser les protocoles d'administration de ces molécules pour l'évaluation de l'efficacité anti-tumorale.

-dans un second temps, un test fonctionnel *in vitro* sera réalisé, préalablement au test d'efficacité *in vivo*, afin de prédire l'efficacité des BS NKCE dans le modèle d'intérêt. Les molécules seront évaluées dans un test de cytotoxicité mettant en présence les cellules tumorales et les NK des souris du modèle d'intérêt.

-dans un troisième temps, l'efficacité anti-tumorale des BS NKCE sera évaluée sur des souris porteuses de tumeurs. Différents modèles de tumeurs seront utilisés les cellules tumorales seront greffées soit en sous-cutané (SC), soit en intraveineuse (IV).

Le nombre total d'animaux est évalué au maximum à 6300 sur 5 ans.

Dans ce contexte, afin de respecter la règle des 3R

-remplacer et réduire le nombre nécessaire de souris a été calculé afin de couvrir les différentes études qui permettront d'investiguer les effets anti-tumoraux des BS NKCE et de fournir des résultats statistiquement significatifs. Les données obtenues pour chaque paramètre sur des animaux traités pourront être comparées aux données obtenues sur des animaux ayant reçu un traitement placebo et/ou traitement de référence et permettre ainsi l'évaluation précise de l'efficacité de nouveaux candidats médicaments.

Le remplacement des animaux est impossible à mettre en place du fait de la nécessité d'étudier l'efficacité dans un modèle *vivo* complexe, impossible à mimer *in vitro*.

-Raffiner Afin de limiter le stress, les animaux sont hébergés de 2 à 5 par cage avec 2 enrichissements de milieu, au minimum.

Dans le cas d'inflammation légère au niveau du site d'injection des cellules tumorales, un nettoyage topique sera effectué.

De plus, les prélèvements sanguins seront réalisés sous anesthésie générale (gazeuse à l'isoflurane) et les volumes ainsi que les fréquences de prélèvement suivront les recommandations du CEEA.

Les points limites relatifs à la perte de poids, à l'apparence et au comportement des animaux (prostration, poils piqués, isolement, difficultés respiratoires (dyspnée), paralysie, etc.), à l'aspect et aux volumes des tumeurs (nécrose, volume supérieur ou égal à 1800mm³), sont des critères qui justifieront le sacrifice des animaux.

14925 La perte de l'intégrité vasculaire participe au développement de nombreuses pathologies qui incluent l'inflammation, les maladies neurodégénératives (maladie d'Alzheimer) et les maladies cardiovasculaires. Ce projet a pour objectif l'identification de nouvelles protéines impliquée dans le maintien de l'intégrité de la paroi des vaisseaux sanguins ce qui permettra d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour limiter l'apparition de dommages vasculaires et le développement consécutif des pathologies citées ci-dessus. Ce projet utilisera des souris transgéniques dans le but d'évaluer les conséquences de la délétion d'un gène d'intérêt dans les cellules vasculaires sur l'apparition de troubles cognitifs ou sur la perméabilité des vaisseaux aux protéines plasmatiques ou aux cellules inflammatoires. Aucune de ces délétions n'induit de phénotype dommageable. Ce programme de recherche sur 5 ans impliquera 1540 souris transgéniques qui subiront un test de perméabilité vasculaire, un stress inflammatoire ou un test comportemental. Réduction Pour réduire le nombre d'animaux, aucune expérience déjà publiée n'est reproduite. Suite à notre expérience, 10 animaux par groupe sont nécessaires pour obtenir des résultats exploitables statistiquement. Remplacement Lorsque cela est possible, les études conceptuelles sont réalisées *in vitro* sur des cellules en culture avant d'être testée *in vivo*. Cependant la physiologie de la paroi vasculaire est complexe et mets en jeu des interactions multiples entre les cellules de la paroi vasculaires et le sang qui ne peuvent pas être reproduites *in vitro* de façon satisfaisante. Raffinement La souffrance des animaux est réduite par l'usage d'anesthésiques et d'antalgiques adaptés pour la réalisation de procédures douloureuses. Finalement les souris sont hébergées en groupe sur de la litière en

cellulose enrichie avec des petits serpentins de papier à dérouler et avec un igloo dans lequel elles peuvent se cacher.

14926 Le syndrome de Takotsubo est une cardiomyopathie aiguë induite par un stress émotionnel ou physique, décrite pour la première fois au Japon en 1990. Il est caractérisé par des anomalies de mouvement de la paroi du ventricule gauche étendues au-delà d'une seule région vasculaire coronaire, donnant au ventricule gauche une forme atypique de piège à poulpe (Takotsubo en Japonais). Il a été récemment reconnu comme étant une pathologie cardiaque mortelle et morbide touchant 1 cas sur 36 000 adultes et 90% des patients sont des femmes ménopausées âgées entre 67-70 ans. Les signes cliniques sont similaires à ceux des syndromes coronariens aigus mais sans obstruction supposée de l'artère coronaire gauche. Sa particularité se repose sur la réversibilité de ces signes au bout de quelques jours à quelques semaines. Cependant, exceptée une poussée aiguë de catécholamines (noradrénaline, adrénaline et dopamine), les mécanismes physiopathologiques, les méthodes de diagnostic non invasives, les biomarqueurs précoces d'imageries et le traitement sont encore mal connus.

L'enjeu de ce projet vise, d'une part, à valider le modèle animal induit par un stress pharmacologique pour par la suite suivre de manière longitudinale, *in vivo* et non invasive l'évolution spatio-temporelle du syndrome afin de comprendre la chronologie des mécanismes physiopathologiques tels que les remodelages anatomique, tissulaire, moléculaire et vasculaire se produisant lors de l'induction de la pathologie et les jours suivant son induction par un système hybride d'imageries médicales simultanées du vivant. Ces nouvelles explorations fonctionnelles vont permettre de comprendre certains paramètres précoces afin de développer des marqueurs prédictifs. Le suivi non invasif et sur du long terme des animaux s'inscrit dans une optique de réduction du nombre d'animaux puisque l'animal sera son propre témoin.

Le modèle animal est induit par une unique injection intrapéritonéale d'un type de catécholamines sur deux espèces un modèle souris C57BL/6J femelle et un modèle rat Wistar femelle. Il est nécessaire de travailler sur ces deux espèces, parce que le rat est l'espèce la plus largement étudiée pour le modèle de Takotsubo dans la littérature et le modèle souris est le modèle privilégié pour étudier de façon précise les voies de signalisation impliquées dans la survenue de la cardiomyopathie via des modèles transgéniques. De ce fait, il s'agirait dans un premier temps de caractériser le lien entre la microcirculation et le métabolisme glucidique chez ce modèle avant d'optimiser le modèle souris.

Il est nécessaire de travailler sur des animaux afin d'étudier la physiologie complète de la pathologie. Le nombre d'animaux a été réduit au maximum tout en respectant les règles de statistique. Au total 240 animaux seront étudiés pour ce projet pour une période de 5 ans 120 rats et 120 souris.

Les animaux seront suivis de façon non invasive par imageries avant l'induction du syndrome (J0) servant de baseline, puis à J1, J3, J7, J14 et à 1 mois. Ce suivi se fera avec deux modalités d'imageries médicales la scintigraphie afin d'observer la captation du glucose par le cœur et une méthode d'échographie ultrarapide et d'échocardiographie haute résolution afin de caractériser la fonction et vascularisation cardiaques.

Les animaux seront hébergés à plusieurs par cage contenant des enrichissements. Ils seront surveillés quotidiennement et leur comportement naturel, l'abreuvement, l'alimentation et leur apparence seront évalués quotidiennement la première semaine suivant l'induction du syndrome puis une fois par semaine durant 1 mois par une grille d'évaluation. Si l'animal présente une fréquence respiratoire élevée ou trop basse, isolement, prostration ou absence de réaction et suivant le score obtenu (5-9), une administration d'antalgiques sera envisagée. Si les signes de faiblesse persistent et si le score est trop élevé (>9) l'animal sera mis à mort par euthasol (100 mg/kg) sous anesthésie générale.

A terme ce projet permettra de valider ces deux méthodes d'imageries pour une utilisation en recherche clinique et de comprendre certains paramètres précoces afin de développer des marqueurs prédictifs.

14927 La douleur neuropathique induite par des lésions du système nerveux périphérique altère considérablement la qualité de vie des patients. Ces douleurs peuvent survenir à la suite de lésion secondaire (diabète, effet secondaire dû à un traitement) ou traumatiques (sections d'un nerf). Ces douleurs se traduisent majoritairement par une allodynie (douleur induite par un stimulus normalement non douloureux) induite par le froid ou le toucher. Sur le plan pharmacologique, la douleur neuropathique répond mal aux antalgiques classiques (Gapabentine et Morphine) d'où le besoin de mise au point de nouvelles molécules.

Un modèle de douleur neuropathique cliniquement pertinent a été mis au point dans notre laboratoire afin de pouvoir évaluer les propriétés antalgiques de nouvelles molécules. Les études d'efficacité antalgique sont exclusivement réalisées chez le rat, offrant des mesures robustes et reproductibles sur la base de modèles parfaitement décrits, calibrés et admis par la communauté scientifique.

Nos activités s'inscrivent dans le respect de la règle des « 3R » pour l'expérimentation animale. Si des méthodes alternatives existent lors des phases précoces de développement d'une molécule (modélisation informatique, ingénierie tissulaire, cellules souches), l'avancement de la caractérisation de la molécule d'intérêt ne permet pas à l'heure actuelle de remplacer l'étude de son efficacité chez l'animal vigile. Les progrès méthodologiques et technologiques couplés aux avancées de la connaissance scientifique permettent d'une part de raffiner les modèles animaux existants et d'autre part de développer et proposer des modèles *in vivo* toujours plus proches des situations cliniques (induction de pathologies, mesures des composantes multiples de la douleur). Le raffinement passe également par la réduction autant que possible de la souffrance et du stress des animaux et l'amélioration de leur bien-être.

Enfin, pour chaque étude, le nombre d'animaux utilisés est réduit à un minimum acceptable pour l'obtention d'informations robustes et statistiquement pertinentes. Dans le cadre de ce projet de caractérisation de l'effet antalgique de molécules en développement, une estimation montre que le nombre d'animaux qui seront utilisés pour la totalité du projet (4 ans) est de 1200 rats répartis dans deux procédures. Durant ces procédures, les actes invasifs seront réalisés sous anesthésie afin de réduire la douleur et l'ensemble des animaux sera suivi afin de pouvoir détecter le plus rapidement possible l'éventuelle atteinte d'un point limite et prendre les mesures adaptées.

L'objectif des études réalisées est de fournir des résultats scientifiques, générés dans le respect systématique des normes éthiques les plus élevées, sur l'intérêt de molécules antalgiques destinées au traitement de diverses pathologies douloureuses chez le patient.

14928 La présente demande d'autorisation de projet concerne le volet pratique de notre formation relative à l'expérimentation animale destinée aux personnels concepteurs et réalisateurs des procédures expérimentales chez l'animal vivant. Conformément à la directive 2010/63/UE et à l'arrêté du 1er février 2013, les travaux pratiques proposés complèteront les connaissances acquises pendant les enseignements théoriques de notre formation spéciale pour rongeurs et lagomorphes. Cette formation proposée deux (2) fois par an s'appuiera sur trois (3) séances de travaux pratiques afin que les apprenants puissent acquérir une base d'expérience pratique permettant de concevoir les procédures et les projets scientifiques utilisant des rongeurs et des lagomorphes dans le cadre de leurs fonctions. Les travaux pratiques sous supervision seront limités aux modèles non consanguins de souris (femelle, CD1) et de rats (mâle, Sprague-Dawley) avec l'objectif de favoriser l'acquisition d'apprentissages pratiques spécialisés notamment dans l'approche, la manipulation et la maîtrise manuelle des rongeurs ainsi que dans l'exécution des techniques d'injection et de prélèvement appropriées pour ce groupe d'espèces. Les mises en situation pratique permettront également aux apprenants d'induire une anesthésie par inhalation et/ou par injection, puis de suivre les différentes étapes de l'anesthésie générale chez les rongeurs. Enfin, les responsables de la formation superviseront la manipulation pratique des animaux par les apprenants lors de leur mise à mort sans cruauté selon les méthodes les plus adéquates pour l'espèce. Une approche progressive prévoyant des méthodes de substitution (simulateurs, vidéos) et l'utilisation d'animaux anesthésiés (non réanimés) permettra de garantir qu'aucune douleur, souffrance ou angoisse ainsi qu'aucun dommage durable ne soient infligés aux animaux lors du passage à l'utilisation d'animaux vivants

après développement d'aptitudes manuelles. Bien que ces méthodes/stratégies pédagogiques alternatives répondent à la règle des trois R (remplacement, réduction, raffinement), ces dernières ne permettent pas une mise en situation pratique des apprenants avec acquisition de gestes réalisés dans le cadre de procédures courantes et peu invasives (sans et avec anesthésie) ce qui justifie l'utilisation d'animaux vivants dans ce cadre de formation pratique. Malgré cela, la formation proposée applique le principe des trois R puisqu'elle 1- réduit le nombre d'animaux en favorisant le travail par binôme avec un nombre de séances limitées, 2- raffine les procédures par un encadrement renforcé dans le cadre d'une formation progressive, et 3- remplace l'animal par des simulateurs et des démonstrations vidéos tout en s'appuyant sur la mise en œuvre d'une méthode alternative. Ainsi, à raison de 30 apprenants par session, la formation prévoit une utilisation d'environ 600 animaux (450 souris et 150 rats) sur une période de 5 ans couvrant la demande d'autorisation de projet qui regroupe des procédures limitées à une gravité légère et/ou sans réveil.

14929 Les hormones glucocorticoïdes (dont le cortisol) interviennent à différents niveaux sur le corps humain en particulier sur la régulation de l'immunité, le métabolisme glucidique, la régulation du stress, la pression artérielle etc...

Le métabolisme des hormones glucocorticoïdes est très fortement régulé par des enzymes, en particulier la conversion du cortisol (principale hormone glucocorticoïde dans l'espèce humaine et composé actif) en cortisone (composé inactif) notamment au niveau du rein. Cependant, les mécanismes contrôlant la régulation de cette enzyme restent mal connus et plusieurs situations pathologiques nous ont conduits à émettre l'hypothèse qu'un des modes de régulation de cette enzyme pourrait être lié aux hormones thyroïdiennes.

Nous allons utiliser le modèle murin pour tester notre hypothèse en introduisant un régime alimentaire permettant d'induire un état d'hyperthyroïdie (excès d'hormones thyroïdiennes) ou un état d'hypothyroïdie (déficit d'hormones thyroïdiennes).

Ce modèle animal, bien connu, maîtrisé et irremplaçable, permet une étude des phénomènes mis en jeu en physiologie et en situation pathologique et sera complémentaire des autres études que nous mènerons sur des modèles cellulaires (analyses moléculaires).

Une semaine avant la fin du traitement, nous prélèverons du sang chez les souris anesthésiées pour vérifier le statut de l'équilibre thyroïdien des souris (eu-, hyper- ou hypothyroïdie) puis elles seront euthanasiées pour prélever les reins afin d'analyser l'expression et l'activité de cette enzyme.

Afin de respecter la règle des 3R, et donc de réduire le nombre d'animaux utilisés à des fins scientifiques, nous limiterons le nombre d'expériences et de souris nécessaires. Le choix de 10 souris par condition, soit un total de 30 souris, permettra néanmoins des analyses statistiques satisfaisantes. Les souris disposent d'enrichissement tel que des maisons en cartons et des copeaux de bois pour faire des nids, raffinant ainsi leurs conditions de vie. Les régimes alimentaires proposés ne devraient pas engendrer de souffrance chez l'animal. Néanmoins, en situation d'hyperthyroïdie, les souris pourraient être beaucoup plus actives. Dans ce cas, nous fournirons plus de copeaux de bois pour leur permettre de se dépenser. A l'inverse, les souris en situation d'hypothyroïdie pourraient être moins actives et pourraient même avoir froid. Dans ce cas, nous fournirons du coton aux souris pour qu'elles préparent des nids plus chaleureux et plus douillets. Une surveillance hebdomadaire sera assurée par le responsable du projet. Des points limites ont été établis qui conduiront à l'euthanasie de l'animal si nécessaire.

L'ensemble de ce travail permettra d'apporter une meilleure compréhension de la régulation du métabolisme des hormones glucocorticoïdes et ouvrira sur de nouvelles stratégies thérapeutiques pour les patients.

14930 La compréhension de la réparation de la peau est un enjeu de santé publique puisqu'elle pourrait permettre l'amélioration du traitement d'épisodes cliniques aiguës (brûlure, choc mécanique...) et chroniques (eczéma, psoriasis...) qui touchent une grande partie de la population. Malgré l'importance de ces processus, les facteurs impliqués dans la réparation tissulaire sont encore mal

connus. Des données préliminaires chez l'homme montrent que certaines cellules de l'immunité, appelées macrophages, synthétisent des molécules bénéfiques pour la cicatrisation.

Nos données, obtenues sur des macrophages humains *in vitro*, montrent que notre facteur d'intérêt régule l'expression d'une partie de ces molécules bénéfiques pour la cicatrisation. L'objectif du projet est de déterminer si ces résultats sont valides *in vivo* et si l'activation de ce facteur via l'alimentation peut améliorer l'efficacité de la cicatrisation.

Pour atteindre cet objectif, il est maintenant nécessaire d'utiliser un modèle murin de cicatrisation cutanée. Dans ce modèle, nous créons une petite blessure sur la peau des souris, et nous observons ensuite la cicatrisation au cours du temps, en prenant soin de protéger la plaie par des pansements. Ce modèle reproduit les étapes de cicatrisation tissulaire observée chez l'Homme, et nous permet de tester la fonction réparatrice de ces cellules dans un environnement complexe plus représentatif d'une situation physiologique. Pour comprendre le rôle de notre molécule d'intérêt, nous comparerons des souris normales et des souris qui ne possèdent pas cette molécule dans certaines cellules immunitaires. De plus, cette molécule peut être activée par des composés issus de l'alimentation. Pour étudier ce phénomène, nous comparerons des souris nourries avec un régime normal ou un régime enrichi pour un composé qui active notre molécule d'intérêt.

Ce projet permettra de définir le rôle d'un facteur impliqué dans le processus de réparation tissulaire.

Nombre d'animaux pour ce projet 432 souris pour ce projet

Remplacer Des données de la littérature montrent que les macrophages, chez l'Homme comme chez la souris, produisent des molécules bénéfiques pour la réparation tissulaire. Nos données obtenues *in vitro* montrent que notre facteur régule l'expression d'une partie de ces molécules bénéfiques. Nous souhaitons donc maintenant confirmer nos résultats dans un modèle *in vivo*. Il n'existe pas de méthode alternative pour réaliser ce travail qui nécessite l'analyse de tissus complexes. Le système immunitaire est un système dynamique dont les acteurs évoluent entre différentes localisations au sein de l'organisme selon des flux très précis. Enfin, certaines populations cellulaires du système immunitaire se spécialisent particulièrement en fonction de leur localisation, en particulier les macrophages. Ainsi, les macrophages de la peau ont certainement une programmation différente de ceux de tout autre organe. Ni les modélisations mathématiques, ni les systèmes *in vitro* ne permettent de reproduire cela, ceci nous oblige donc à utiliser des animaux afin de comprendre les interactions cellulaires nécessaires pour la cicatrisation cutanée.

Réduire Le nombre de souris à utiliser a été calculé pour obéir aux minima nécessaires à des analyses statistiques valides, condition nécessaire pour une interprétation biologique des résultats.

Raffiner Les animaux seront suivis quotidiennement afin d'assurer leur bien-être et pour surveiller les éventuels signes de douleur, de souffrance ou de stress. Des points-limites ont été établis.

La cicatrisation complète est attendue en 10 à 15j et nous veillons à éviter toute contraction épithéliale, douloureuse et non représentative de la réparation tissulaire humaine.

14931 Parmi les approches thérapeutiques anticancéreuses, la radiothérapie externe constitue la principale technique non chirurgicale utilisée pour le traitement de patients atteints de cancer. Toutefois, les doses de radiations délivrées au sein de la tumeur sont limitées du fait des effets indésirables subis par les tissus sains. L'utilisation de nanoparticules à base d'atomes lourds (e.g. or, hafnium, gadolinium) permet d'augmenter l'efficacité des rayonnements.

Nous avons développé des nanoparticules de silice pouvant être radiosensibilisantes et nous allons dans un premier temps étudier leur biodistribution dans des modèles précliniques de lymphome et cancer du sein.

Le nombre d'animaux inclus dans ce projet a été optimisé conformément à la règle des 3Rs (Remplacement, Réduction, Raffinement). L'ensemble du projet comprendra 240 souris nues sur 5 années.

Ce nombre a été calculé afin de garantir une valeur statistique à l'étude menée.

En effet, de nombreuses études *in vitro* réalisées en amont ont permis de remplacer l'utilisation des animaux. Cependant, ces études sur cellules ne peuvent pas se substituer aux études sur un

organisme entier afin d'évaluer les effets potentiellement indésirables sur d'autres organes. Au cours de ce projet, le nombre d'animaux nécessaire est réduit au maximum en sélectionnant uniquement les expérimentations essentielles.

La surveillance quotidienne des animaux permettra de déceler les premiers signaux de stress, de douleurs ou d'inconfort pour l'animal qui pourront être améliorés par l'administration d'antalgiques avant l'atteinte des points limites définis. Les conditions d'hébergement seront optimisées (portoirs ventilés, température, hygrométrie, luminosité, densité animale, enrichissement de milieu avec coton pour la nidification, bâtonnet de bois pour ronger et cabane de cachette).

14932 Le syndrome de Takotsubo est une cardiomyopathie aiguë induite par un stress émotionnel ou physique, décrite pour la première fois au Japon en 1990. Il est caractérisé par des anomalies de mouvement de la paroi du ventricule gauche étendues au-delà d'une seule région vasculaire coronaire, donnant au ventricule gauche une forme atypique de piège à poulpe (Takotsubo en japonais). Il a été récemment reconnu comme étant une pathologie cardiaque mortelle et morbide touchant 1 cas sur 36 000 adultes et 90% des patients sont des femmes ménopausées âgées entre 67-70 ans. Les signes cliniques sont similaires à ceux des syndromes coronariens aigus mais sans obstruction supposée de l'artère coronaire gauche. Sa particularité se repose sur la réversibilité de ces signes au bout de quelques jours à quelques semaines.

Cependant, exceptée une poussée aiguë de catécholamines (noradrénaline, adrénaline et dopamine), les mécanismes physiopathologiques, les méthodes de diagnostic non invasives, les biomarqueurs précoces d'imageries et le traitement sont encore mal connus.

L'enjeu de ce projet vise, d'une part, à valider le modèle animal induit par un stress pharmacologique pour par la suite suivre de manière longitudinale, *in vivo* et non invasive l'évolution spatio-temporelle du syndrome afin de comprendre la chronologie des mécanismes physiopathologiques tels que les remodelages anatomique, tissulaire, moléculaire et vasculaire se produisant lors de l'induction de la pathologie et les jours suivant son induction par un système hybride d'imageries médicales simultanées du vivant. Ces nouvelles explorations fonctionnelles vont permettre de comprendre certains paramètres précoces afin de développer des marqueurs prédictifs. Le suivi non invasif et sur du long terme des animaux s'inscrit dans une optique de réduction du nombre d'animaux puisque l'animal sera son propre témoin.

Le modèle animal est induit par une unique injection intrapéritonéale d'un type de catécholamines sur deux espèces un modèle souris C57BL/6J femelle et un modèle rat Wistar femelle. Il est nécessaire de travailler sur ces deux espèces, parce que le rat est l'espèce la plus largement étudiée pour le modèle de Takotsubo dans la littérature et le modèle souris est le modèle privilégié pour étudier de façon précise les voies de signalisation impliquées dans la survenue de la cardiomyopathie via des modèles transgéniques. De ce fait, il s'agirait dans un premier temps de caractériser le lien entre la microcirculation et le métabolisme glucidique chez ce modèle avant d'optimiser le modèle souris. Il est nécessaire de travailler sur des animaux afin d'étudier la physiologie complète de la pathologie. Le nombre d'animaux a été réduit au maximum tout en respectant les règles de statistique. Au total 240 animaux seront étudiés pour ce projet pour une période de 5 ans 120 rats et 120 souris. Les animaux seront suivis de façon non invasive par imageries avant l'induction du syndrome (J0) servant de baseline, puis à J1, J3, J7, J14 et à 1 mois. Ce suivi se fera avec deux modalités d'imageries médicales la scintigraphie afin d'observer la captation du glucose par le cœur et une méthode d'échographie ultrarapide et d'échocardiographie haute résolution afin de caractériser la fonction et vascularisation cardiaques.

Afin de réduire toute forme de douleur ou de stress, plusieurs des procédures sont réalisées sous anesthésie générale. Enfin des points limites adaptés sont définis entraînant le cas échéant une mise à mort anticipée de l'animal.

A terme ce projet permettra de valider ces deux méthodes d'imageries pour une utilisation en recherche clinique et de comprendre certains paramètres précoces afin de développer des marqueurs prédictifs.

14933 La coccidiose est une maladie parasitaire qui touche les élevages de volailles dans le monde entier. Cette maladie est causée par plusieurs espèces de protozoaires du genre *Eimeria* qui s'installent dans le tube digestif et induisent des lésions plus ou moins importantes affectant la croissance et le bien-être de l'animal. Parmi ces espèces, *Eimeria tenella* est particulièrement pathogène du fait des lésions sanguinolentes qu'elle induit au niveau du caecum de l'animal, pouvant provoquer de fortes anémies voire la mort des animaux les plus infestés. Actuellement les traitements reposent essentiellement sur l'utilisation de différentes familles d'anticoccidiens qui tendent à être progressivement retirés du marché (certains sont des antibiotiques) de manière à limiter l'utilisation des intrants en élevage. La vaccination repose quant à elle exclusivement sur l'administration de souches d'*Eimeria* sp. Atténuées, présentant un coût important ainsi qu'un risque potentiel d'induction de la maladie chez certains individus. Il est donc urgent de proposer des méthodes alternatives de contrôle de ces maladies parasitaires. Parmi les solutions possibles, l'utilisation de plantes bioactives est prometteuse. Des études ont d'ores et déjà montré l'efficacité de certains composés tels que le capsicum ou le curcuma pour réduire les effets de pathologies intestinales.

Dans ce projet, nous voulons évaluer l'effet de trois composés bioactifs sur une infection à *Eimeria tenella* chez des poulets de chair de race Ross PM3 en comparaison avec un groupe d'animaux non supplémenté. L'objectif étant d'évaluer le potentiel de chaque bioactif comme alternative aux anticoccidiens.

Pour ce projet, nous utiliserons 240 animaux répartis en 5 groupes homogènes (poids) auxquels nous ajouterons un effectif d'animaux représentant environ 20% de l'effectif total (en cas de mortalité ou de défaut de croissance), soit au total 280 animaux. Les groupes seront les suivants 1- non infecté 2- infecté non supplémenté 3- infecté traité avec le composé 1 4- infecté traité avec le composé 2 5- infecté et supplémenté avec le composé 3. Des données préliminaires confidentielles ont montré que les composés utilisés ne présentent aucune toxicité. Chaque groupe sera composé de 6 cages de 8 animaux qui seront élevés jusqu'à 35 jours. Nous suivrons au cours du temps la prise alimentaire, la prise de poids, l'excrétion d'oocystes dans les fèces ainsi que les lésions intestinales. Pour ce dernier point, trois animaux par cage seront euthanasiés et autopsiés à J20 puis J35. Tous les animaux seront euthanasiés à J35.

Ce protocole sera mené dans le respect de la règle des 3 R

- Remplacer l'effet d'une infection à *Eimeria* sur l'intégrité de l'intestin ne peut être étudié qu'*in vivo*. Nous n'avons pas de modèle alternatif pour réaliser ce protocole.

- Raffiner Les animaux auront à leur disposition des perchoirs leur permettant d'exprimer un comportement naturel. Après inoculation de l'agent infectieux, une visite quotidienne est réalisée dans la salle expérimentale afin de surveiller l'éventuelle apparition des premiers symptômes liés à la maladie (plumes ébouriffées, prostration, ailes pendantes) le point limite est atteint lorsque l'état de prostration est tel que l'animal ne s'alimente plus pendant 24h.

- Réduire le design expérimental a été fait pour permettre de réduire au maximum le nombre d'animaux inclus tout en ne compromettant pas l'exploitation des résultats. Pour le paramètre score de lésion pour lequel nous aurons les effectifs les plus petits (18 animaux/groupe), la puissance statistique calculée à partir de données issues d'essais préliminaires est de 96% avec un seuil alpha de 0.05 pour un test de Kruskal et Wallis.

14934 L'infection urinaire masculine, fréquemment appelée prostatite, est souvent présentée comme l'association d'une fièvre et de symptômes du bas appareil urinaire (brûlures mictionnelles, envie fréquente d'uriner, impossibilité d'uriner). Source d'hospitalisation chez des patients de plus en plus âgés, des difficultés thérapeutiques apparaissent de plus en plus fréquemment par la complexité des bactéries pathogènes rencontrées et notamment l'augmentation des résistances. L'infection urinaire masculine, bien que présentée parfois comme une pathologie « commune » est pourtant fréquemment source d'infections graves et parfois, en l'absence de prise en charge urgente, mortelles si passage de la bactérie dans le sang. Une meilleure efficacité des traitements dans la prise en charge des infections urinaires masculines débute dans un premier temps par une meilleure compréhension de la distribution des antibiotiques au sein du tissu prostatique infecté. Des

techniques comme la microdialyse offre la possibilité d'évaluer la diffusion tissulaire des antibiotiques aussi bien chez l'animal que chez l'homme, ceci permettant une optimisation de la prise en charge des infections.

La gépotidacine est un nouvel antibiotique, inhibiteur de la topoisomérase de type II, en cours de développement. Elle est indiquée dans le traitement des infections des voies urinaires non compliquées à Entérobactéries ou les gonorrhées urogénitales (attribuées communément à *Neisseria gonorrhoeae*). Toutefois, son indication pourrait être étendue au traitement des prostatites aiguës ou chroniques d'origine bactérienne. L'objectif de ce projet est donc d'évaluer la distribution prostatique de la gepotidacine par microdialyse chez le rat infecté par une prostatite à entérobactérie et de comparer ces concentrations prostatiques aux concentrations de gepotidacine obtenues après homogénéisation de la prostate (technique empirique mais toujours de référence).

Le nombre d'animaux nécessaire pour ce projet est de 78 au total.

Les dispositions prises pour l'application de la règle des 3R seront les suivantes

- « Remplacer » La distribution pharmacocinétique systémique et/ou tissulaire d'un médicament ne peut pas être évaluée par des méthodes *in vitro*. Elle peut être cependant évaluée par quelques méthodes ex-vivo mais qui nécessite aussi l'utilisation d'animaux pour les prélèvements d'organes.
- « Réduire ». La technique de microdialyse est une technique qui peut être utilisée dans plusieurs tissus pour un même animal et qui permet en plus de réaliser de nombreuses mesures de concentration dans un tissu et ceci sur le même animal. L'utilisation de cette technique permet d'obtenir des données pharmacocinétiques très riches en limitant le nombre d'animaux utilisés. De plus, une étude statistique a été utilisée afin de réduire au maximum le nombre d'animaux permettant d'obtenir une puissance statistique suffisante dans le traitement des résultats.
- « Raffiner ». Les animaux infectés et leurs contrôles sont respectivement hébergés dans un environnement A2 enrichi (rouleaux de papier, bâtonnets à ronger) et dans un environnement conventionnel enrichi avec accès "ad libitum" à l'eau et à la nourriture. Les techniques chirurgicales sont réalisées sous anesthésie sous une analgésie pré-opératoire et post-opératoire (buprénorphine). Le suivi des animaux permettant d'identifier des signes de souffrance post infection, caractérisés par l'état du pelage, le comportement du rat, la perte de poids () sera également réalisé. L'ensemble de ses signes sera collecté dans une grille d'évaluation du bien-être animal engendrant des prises de décisions comme l'addition d'une dose d'analgésique supplémentaire si nécessaire.

14935 Notre projet de recherche vise à développer des stratégies thérapeutiques innovantes applicables aux pathologies d'origine génétique pour lesquelles il n'existe aucun traitement. Nous nous intéressons plus particulièrement aux maladies neuromusculaires.

Nos stratégies se basent sur des approches de thérapie génique, c'est-à-dire le transfert de gènes thérapeutiques dans les tissus cibles, et sur des stratégies antisens, utilisant des molécules oligonucléotidiques capables d'interférer avec la machinerie génétique des cellules pour rétablir l'expression de la protéine à l'origine défectueuse. Plusieurs types de vecteurs de gènes (viraux et non viraux) et d'oligonucléotides antisens sont évalués dans le cadre de ces stratégies. L'ensemble de ces outils moléculaires est tout d'abord évalué *in vitro* (remplacement) afin de sélectionner les candidats les plus prometteurs et de remplacer autant que possible l'évaluation *in vivo* (réduction). Le développement pré-clinique des molécules les plus prometteuses requiert cependant une évaluation thérapeutique *in vivo* sur des modèles rongeurs appropriés et nous utilisons pour cela des modèles murins des différentes pathologies (Dystrophie musculaire de Duchenne et Amyotrophie spinale) ainsi que des souches de souris et de rats contrôles. Ce projet de recherche d'une durée de 5 ans requiert l'utilisation de 900 animaux par an au maximum. Les modèles murins utilisés dans ce projet présentent des phénotypes peu dommageables et les procédures employées ont toutes pour objectif de corriger le phénotype pathologique des animaux, et seront réalisés avec une anesthésie et une analgésie adaptée. De plus, tous les rongeurs seront surveillés quotidiennement afin de détecter tout signe de douleur, souffrance et angoisse (raffinement). Ce projet de recherche translationnelle vise à développer des candidats cliniques pour le traitement

des maladies neurosmusculaires et leur évaluation préclinique sur des modèles murins est donc indispensable mais sera bien évidemment restreinte aux candidats les plus prometteurs issus d'une sélection *in vitro*. De plus,

14936 *Clostridium difficile* (*C. difficile*) est la première cause de diarrhée bactérienne nosocomiale chez l'adulte dans les pays développés et en particulier en France (> 24000 cas par an, dont 14 % de formes compliquées, la plus connue étant la colite pseudomembraneuse, associée à 3% de mortalité). Les infections à *C. difficile* représentent un coût sanitaire important, en raison de l'augmentation des durées moyennes de séjours et du surcoût des soins associés. Malgré des traitements antibiotiques efficaces, les récurrences des infections à *C. difficile* sont fréquentes (environ 20%) et des résistances aux antibiotiques apparaissent. Les récurrences pourraient être liées à la persistance des spores dans l'intestin mais également à la persistance de la bactérie dans sa niche colique sous forme de biofilm. Le biofilm est une communauté bactérienne présentant une structure particulière qui se développe sur différents supports et qui est à l'origine d'une protection vis-à-vis des conditions environnementales éventuellement néfastes pour la bactérie comme la présence d'antibiotique. Les analyses faites en modèle souris nous permettront d'étudier l'impact de métabolites ou de microorganismes sur la formation du biofilm de *C. difficile* chez l'hôte et nous permettront d'identifier de nouvelles stratégies de lutte contre les infections à *C. difficile*. Les essais seront réalisés en utilisant des souris sans germes (souris axéniques) infectés soit par *C. difficile* seul (en présence de métabolites choisis pour leur effet *in vitro*) soit par *C. difficile* associé à un autre microorganisme. Les biofilms monomicrobiens et mixtes seront analysés par l'étude de la colonisation de ces microorganismes au niveau du tractus digestif, par l'étude de la distribution des microorganismes par microscopie confocale à balayage laser et par l'étude de la localisation des microorganismes au niveau de la muqueuse intestinale par immunohistochimie.

L'exigence de réduction, raffinement, et remplacement des animaux sera respectée

Remplacement Les caractéristiques du biofilm bactérien dépendent en partie du support sur lequel il se développe. Aussi le recours à l'animal est indispensable pour étudier le rôle du biofilm dans le processus infectieux.

Réduction une planification statistique minutieuse a permis de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en préservant la validité statistique de l'étude afin d'avoir une puissance statistique suffisante pour observer un effet. Les groupes contrôles des animaux ont été mutualisés aussi souvent que possible. Au total, un nombre maximal de 420 souris sera nécessaire pour la procédure de cette étude. Par ailleurs, seules des souches testées en amont *in vitro* pour leur capacité à former des biofilms, seront testées en modèle animal.

Raffinement les animaux seront surveillés quotidiennement et leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer qu'ils subissent le minimum de stress possible. En particulier, les litières seront changées quotidiennement et les animaux auront un accès direct et illimité à l'eau de boisson et à la nourriture. La procédure sera pratiquée si nécessaire en utilisant des anesthésiques permettant de limiter la souffrance des animaux qui bénéficieront d'une procédure d'euthanasie anticipée et une sortie d'étude prématurée en cas d'atteinte des points limites éthiquement non acceptables.

14937 La recherche de nouvelles matières premières ou d'additifs alimentaires est une préoccupation majeure en production porcine, en particulier pour s'affranchir de l'utilisation de matières premières d'importation ou limiter l'utilisation de traitements antibiotiques. Les phases de développement de ces nouvelles matières premières ou additifs alimentaires nécessitent de valider les valeurs nutritionnelles ou les effets des additifs lors d'essais où les performances de croissance des animaux sont mesurées précisément. L'objectif du projet est de mesurer la consommation d'aliment et les performances de croissance des porcelets après le sevrage (de 10 à 35 kg de poids vif, soit pendant une durée de 50 jours) lorsque les animaux reçoivent un aliment contenant les matières premières ou additifs à tester. Pour cela, les animaux sont hébergés individuellement et leur consommation d'aliment est mesurée quotidiennement. Les animaux sont pesés toutes les semaines. Le statut métabolique des animaux est évalué par huit prises de sang effectuées à au

moins une semaine d'intervalle. Une caractérisation de la flore digestive des animaux est réalisée par prélèvement de fèces chaque semaine.

Le projet est prévu pour une durée de 5 ans. Annuellement, nous estimons avoir à mettre en place 15 modalités expérimentales. Pour chaque modalité expérimentale, il est nécessaire de prévoir 24 animaux, soit 360 animaux par an et 1800 animaux pendant toute la durée du projet.

Règle des 3R. Le remplacement n'est pas possible car l'utilisation d'animaux est inhérente au type d'étude (caractérisation des nouvelles matières premières pour l'espèce-cible). Nous avons réduit le nombre d'animaux au minimum statistique en fonction des mesures effectuées. Toutes les mesures seront réalisées par du personnel formé et expérimenté. Les animaux bénéficieront d'un suivi très proche par les animaliers ainsi que par les différents intervenants. Toute intervention potentiellement douloureuse ou stressante sera contrôlée, et les animaux suivis dans les minutes ou heures qui suivent. En cas de souci de santé, le vétérinaire sera consulté et les animaux traités en conséquence. A la fin de l'étude et si les matières premières sont inscrites au catalogue officiel de l'Union Européenne, les animaux réintégreront une structure d'élevage.

14938 Les troubles envahissants du développement, dont les troubles du spectre autistique (TSA) sont associés à des dysfonctionnements du comportement, de la cognition et de la perception. Nous voulons caractériser les dysfonctions dans les ganglions de la base notamment impliqués dans la motricité et la gestion des émotions et de disséquer les réseaux neuronaux impliqués dans ce trouble au niveau anatomique et électrophysiologique. L'objectif du projet est d'étudier un modèle animal double transgénique la souris « PV cre x CNTNAP2 KO » (fond génétique C57BL/6J) pour lequel nous avons déjà reçu une validation du ministère. Cette souris a les caractéristiques physiopathologiques de l'autisme (CNTNAP2 KO) avec la particularité de pouvoir cibler les interneurons Parvalbumines (PV) (PV Cre). Nous allons analyser les réseaux neuronaux impliqués dans ce trouble au niveau anatomique, électrophysiologique et comportemental. Les modèles animaux de souris dans ces pathologies se sont révélés d'une grande utilité car ils permettent une étude horizontale allant de l'observation comportementale, à l'analyse des réseaux neuronaux et la détermination des messagers chimiques sous-jacents.

Nous utiliserons dans ce projet 615 souris

Afin d'être en conformité aux règles 3R

1) Remplacer Le projet vise à utiliser une lignée de souris double transgénique qui permettra de caractériser les dysfonctionnements cognitifs et moteurs d'un modèle animal des TSA. Il n'est donc pas envisageable d'utiliser des méthodes de substitution à l'animal entier.

2) Réduire (i) nous utiliserons des protocoles expérimentaux utilisés en routine dans le laboratoire qui ne nécessitent pas d'optimisation, (ii) nous utiliserons les mâles et les femelles pour notre étude et collecterons le maximum d'échantillons possible afin d'extraire le plus d'information par animal sacrifié, (iii) Un calcul de puissance statistique a été utilisé pour minimiser le nombre d'animaux nécessaires pour obtenir des données significatives.

3) Raffiner Nous mettrons tout en œuvre pour soulager l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'angoisse des animaux.

Les animaux seront regroupés pour ne pas être isolés. Lors de la chirurgie, ils seront anesthésiés à l'isoflurane, le site d'incision sera traité avec de la lidocaïne. Afin de ne pas endommager la cornée, une crème ophtalmique sera déposée sur les yeux de l'animal. Suite à l'opération, les animaux recevront une injection de ketoprofène.

14939 Description du problème La radiothérapie est couramment utilisée dans le traitement de tumeurs cérébrales primaires et des métastases, c'est à dire de tumeurs qui se sont formées à partir de cellules cancéreuses qui sont détachées d'une tumeur primaire présente dans un autre organe et qui ont migrées par le système circulatoire. La moitié des patients vont vivre plus de six mois et un nombre important va à terme guérir. Cependant, environ 50% des survivants expérimenteront un déclin cognitif qui aura des effets profonds sur leur qualité de vie. Il n'existe à ce jour aucun

traitement médical ayant une efficacité prouvée qui puisse prévenir les troubles cognitifs associés aux radiothérapies cérébrales.

Données du laboratoire La cascade des événements responsable de cette complication n'est pas clairement établie, notamment les étapes précoces qui vont induire les troubles cognitifs tardifs. Récemment, nous avons montré que les péricytes (cellules associées aux capillaires sanguins) jouent un rôle essentiel dans le développement des altérations cellulaires précoces liées à la radiothérapie. Les rayonnements ionisants provoquent un détachement des péricytes responsable de dysfonctionnements de la Barrière Hémato-Encéphalique (BHE) (barrière physiologique présente dans le cerveau entre la circulation sanguine et le système nerveux central) et d'une augmentation de la perméabilité vasculaire. Il en résulte une cascade d'événements inflammatoires responsables de la destruction tardive du tissu nerveux. Cette complexité est difficile à reproduire *in vitro* justifiant pleinement l'utilisation des modèles animaux. Nous avons également montré qu'un traitement prophylactique par la Thalidomide, c'est à dire un traitement permettant de prévenir les effets nocifs de la radiothérapie prévenait le détachement des péricytes et stabilisait les capillaires sanguins empêchant l'ouverture de la BHE. La thalidomide est une molécule dérivée d'un acide aminé, la glutamine qui possède des propriétés anti-inflammatoires et qui module le système immunitaire, notamment utilisée dans le traitement des myélomes multiples.

Objectif Il s'agit d'évaluer le bénéfice d'un traitement prophylactique par la Thalidomide sur les effets à long terme de l'irradiation cérébrale en analysant la réponse hémodynamique, c'est à dire les fluctuations mécaniques de la circulation du sang comme la pression ou le débit chez les souris par imagerie ultrasonore ultrarapide et de comparer ces données aux résultats des tests comportementaux réalisés (DAP 2041-01). L'objectif final est de démontrer l'intérêt d'un traitement prophylactique par la thalidomide chez les patients subissant une radiothérapie cérébrale afin de prévenir les effets indésirables.

Méthodologie Analyse de la réponse hémodynamique par imagerie ultrasonore ultra-rapide sur la zone somato-sensorielle de la souris anesthésiée après stimulation de la moustache. Le temps nécessaire pour réaliser l'ensemble des acquisitions en imagerie est évalué à 10 jours. Après sacrifice des animaux les cerveaux seront prélevés pour des analyses immuno-histologiques.

Le nombre de souris utilisées dans notre projet est réduit à son minimum dans la limite de ce qui est requis pour obtenir des résultats scientifiques et statistiques valides, comme précédemment publiés. Quatre groupes de 6 souris mâles et quatre groupes 6 souris femelles (influence du sexe des animaux sur les résultats) seront comparés (contrôle, irradié, irradié + thalidomide et irradié + analogue inactif) à 2 et 6 mois. Le nombre de souris utilisées dans notre projet est réduit à son minimum dans la limite de ce qui est requis pour obtenir des résultats scientifiques et statistiques valides, comme précédemment publiés. L'irradiation cérébrale affecte de nombreux types cellulaires et fonctions notamment le flux sanguin et ne peut pas être modéliser *in vitro*. La souris est particulièrement appropriée pour étudier les effets de l'irradiation cérébrale notamment la composante vasculaire et les problèmes cognitifs induits en raison de la littérature abondante sur ce sujet. Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soin et les méthodes utilisées sont en ligne avec les recommandations afin de réduire au maximum souffrance, douleur, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux. Pour toute expérimentation invasive, des anesthésiques et des analgésiques seront utilisés, selon les recommandations établies.

La procédure d'amincissement du crâne est nécessaire pour obtenir une imagerie de qualité et mesurer les modifications hémodynamiques pour des souris âgées de 3 mois et plus. Elle est réalisée sous anesthésie avant l'imagerie fUS (sans réveil de l'animal). Cette procédure n'altère pas les fonctions cognitives de la souris pour les analyses. Par contre, le maintien de ces animaux sur le long-terme doit se faire sous analgésiques afin de réduire la souffrance de l'animal, il est également nécessaire de réaliser une nouvelle d'amincissement du crâne pour une analyse de ces souris à 6 mois. Ces contraintes étant susceptibles d'altérer les résultats, Nous ferons des expériences sur des groupes indépendants à 2 et 6 mois qui seront traités à l'identique (1 procédure d'amincissement de l'os du crâne suivie de l'imagerie sous anesthésie et sacrifice des animaux).

Le nombre total de souris demandé est donc de 96.

14940 Nous avons montré, par de nombreuses expériences *in vitro*, qu'un composé de synthèse, le mannodendrimère Gc3Tri, est doué de propriétés anti-inflammatoires. Cet effet a été confirmé *in vivo* dans un modèle d'inflammation pulmonaire aiguë (modèle LPS) chez la souris. Il se traduit notamment par un moindre influx des neutrophiles dans les poumons des animaux.

Nous proposons de tester l'effet de ce mannodendrimère dans un contexte infectieux, et plus particulièrement dans le cas d'une infection à *Francisella*, agent, chez les mammifères, de la tularémie, dont la forme pulmonaire est souvent fatale. Nous avons choisi cette bactérie pour trois raisons. D'une part c'est un bon modèle de septicémie, qui est la deuxième cause de mortalité des patients admis en soins intensifs. D'autre part, *Francisella tularensis* fait l'objet d'intenses recherches car elle est considérée comme le plus probable agent de bioterrorisme. Enfin *Francisella novicida* n'est pas pathogène pour l'homme mais reproduit, chez la souris, toutes les caractéristiques de la tularémie humaine. La gravité de la maladie, que ce soit chez l'homme ou chez l'animal, est dépendante de la voie d'infection. Si la voie cutanée résulte en une forme bénigne, l'infection par aérosol conduit à une mortalité de 35% sans traitement, avec des doses aussi faibles que 10 à 50 micro-organismes. Nous utiliserons donc la voie aérienne pour administrer la bactérie aux animaux. Une fois infectées, les souris ne développent aucun signe pathologique pendant les premières 24h, puis une forte réaction inflammatoire survient, se traduisant par la production de cytokines et de chimio-attractants. Ces derniers permettent notamment le recrutement d'un grand nombre de neutrophiles. Cette forte réaction immune, qui ne peut juguler la multiplication bactérienne, est à l'origine d'atteintes du tissu pulmonaire. La septicémie apparaît rapidement et les souris meurent en 4 à 6 jours. L'hypercytokinémie (forte concentration de cytokines) et l'accumulation de neutrophiles dans les tissus sont des facteurs aggravants de la maladie.

Le but du protocole est donc d'évaluer l'impact de l'action anti-inflammatoire du Gc3Tri sur l'évolution de l'infection en association ou non avec une antibiothérapie. Cet effet sera comparé à un anti-inflammatoire non stéroïdien, l'ibuprofène. Pour cela nous déterminerons l'effet de l'administration intraveineuse du mannodendrimère sur l'évolution de l'infection des souris par *Francisella novicida*. Les paramètres suivants seront mesurés sur vie des souris, charge bactérienne dans les organes (poumons, foie, rate et sang), dosage des cytokines et numération des neutrophiles dans les poumons.

L'étude comprend 6 expériences et nécessitera 3513 souris maximum réparties par groupe de 15 à 20 selon les expériences. Dans ce modèle expérimental, comme dans la plupart des modèles d'investigation *in vivo*, la variabilité inter individuelle en réponse à un stimulus est importante et ne nous permet pas de diminuer le nombre d'animaux par groupe afin d'obtenir une puissance statistique satisfaisante.

L'état général des animaux (poil hérissé, hypo- ou hyperactivité...), la physiologie (rythme respiratoire, température corporelle), le comportement alimentaire, ainsi que la prise de poids des animaux seront suivis deux fois par jour. Les signes pathologiques spécifiques de la maladie, tels que démarche voûtée, écoulement oculaire seront également pris en compte.

Ces différents critères permettront d'appréhender au mieux l'effet de l'infection et des produits testés et/ou la douleur qu'ils pourraient engendrer. Dans une expérience précédente, nous avons défini une température corporelle de 35°C comme point limite. Tous signes et comportements anormaux et/ou température corporelle inférieure à 35 °C et/ou perte de poids de plus de 20 % des animaux entraîneront l'exclusion de ces derniers qui seront ensuite euthanasiés.

L'utilisation d'antibiotique pour certains lots de souris nous permettra de contrôler l'infection bactérienne et donc de réduire la douleur des animaux traités. Les animaux seront euthanasiés dès qu'un point limite sera atteint et leurs organes seront prélevés et un dénombrement bactérien sera réalisé, ne remettant pas en cause l'expérience.

14941 Contexte scientifique, médical et social

La maladie d'Alzheimer (MA) est la forme la plus fréquente de démence et affecte près de 900 000 personnes en France. La MA est principalement caractérisée par des altérations cognitives comme la perte de mémoire, mais une majorité de patients souffrent aussi de symptômes dépressifs. La

dépression est un facteur aggravant dans la MA, qui accélère la progression de la démence. De plus, ce symptôme est souvent résistant aux traitements antidépresseurs avec un impact important sur la qualité de vie des patients et de leur entourage.

L'existence d'un lien entre la physiopathologie de la MA et la dépression n'est pas clairement établie. Dans ce cadre, cette étude vise à étudier les mécanismes cellulaires qui sous-tendent les symptômes dépressifs dans la MA. Cela pourra permettre, à terme, de d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques afin de réduire les symptômes dépressifs et potentiellement la progression de la MA.

La grande majorité des études précliniques sur la MA se focalisent sur les régions du cerveau impliquées dans les déficits de la mémoire et néglige l'étude des régions dysfonctionnelles dans la dépression.

Dans le cerveau, les astrocytes sont des cellules de soutien qui interagissent de manière complexe avec les neurones et garantissent leur bon fonctionnement. Dans les maladies neurologiques comme la MA, ces interactions sont modifiées et participent à la progression de la maladie. De récentes études suggèrent que les astrocytes sont aussi dysfonctionnels dans des modèles animaux de dépression. Ainsi, dans ce projet, nous proposons d'évaluer le potentiel des astrocytes comme nouvelles cibles thérapeutiques pour les symptômes dépressifs dans un modèle souris de la MA.

Description des objectifs du projet

Les objectifs de ce projet sont de

1. Déterminer le rôle des astrocytes présents dans différentes régions du cerveau impliquées dans les symptômes dépressifs observés dans un modèle souris de la MA
2. Cibler les astrocytes dans ces régions cérébrales pour réduire les symptômes dépressifs dans un modèle souris de la MA
3. Explorer les différences moléculaires dans ces régions cérébrales pouvant sous-tendre les symptômes dépressifs dans un modèle souris de la MA

Les résultats attendus sont de déterminer le rôle des astrocytes dans les symptômes dépressifs dans la MA dans différentes régions du cerveau afin de les cibler à des fins thérapeutiques.

Grâce à une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans les symptômes dépressifs dans la MA, ce projet pourrait permettre de développer de nouveaux outils pour détecter les symptômes dépressifs de la MA et d'améliorer la prise en charge et la qualité de vie des patients.

Ce projet prévoit l'utilisation de modèles animaux rongeurs (souris) qui est le seul modèle animal permettant de mettre en place toutes les approches expérimentales nécessaires à sa réalisation. Les méthodes expérimentales (injections de vecteurs viraux ciblant d'importantes fonctions astrocytaires par différentes voies d'administration (euthanasie) ont été choisies en accord avec le vétérinaire de l'installation, pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux.

Conformité de la règle des 3R

Ce projet prévoit l'utilisation d'un modèle souris car il n'existe pas de méthodes substitutives pertinentes. En effet, ce projet vise à étudier les altérations cérébrales liées à des maladies neurologiques (MA et dépression) qui ne peuvent être appréhendées par la modélisation informatique ou l'expérimentation sur cellules *in vitro*. Notre projet s'intéresse aux interactions entre les neurones et les astrocytes que seule une étude du cerveau entier *in situ* permet de conserver. Enfin, ce projet se focalise spécifiquement sur l'étude de symptômes neuropsychiatriques qui ne peuvent être mis en évidence que via une étude du comportement.

L'utilisation de souris pour cette étude se justifie par 1) la conservation de certains aspects des symptômes dépressifs observés chez l'humain (manque de motivation, comportement d'abandon, anxiété) 2) la proximité du fonctionnement cérébral entre la souris et l'humain pour étudier de façon pertinente leurs bases cellulaires.; 3) nous disposons d'un modèle transgénique murin de la MA. Ce modèle est pertinent car il présente les mêmes mutations génétiques que celles observées dans

les formes familiales de la MA conduisant au développement de troubles cognitifs et neuropsychiatriques similaires à ceux rapportés dans la pathologie humaine.

Le projet prévoit au maximum 353 souris nés et élevés dans notre élevage. Le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux sera réduit au minimum nécessaire permettant une interprétation statistique fiable des résultats. Les animaux seront étudiés grâce à des tests comportementaux indolores et non-invasifs et des analyses biochimiques, histologiques et de biologie moléculaire.

Le suivi quotidien des rongeurs hébergés en groupe dans un milieu enrichi et l'application de critères d'arrêts en élevage et en expérimentation, permettra de garantir leur bien-être. En cas d'apparition d'effets inattendus, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés. La gestion de la douleur et de l'inconfort liée aux procédures expérimentales mettra en œuvre des méthodes d'anesthésie et d'analgésie pré- et post-opératoire, un soutien nutritionnel et thermique, ainsi qu'un suivi clinique post-opératoire incluant la prolongation des traitements analgésiques si besoin.

14942 Le projet présenté vise à mettre en place un protocole de transplantation des cellules souches germinales chez le bar (*Dicentrarchus labrax*) qui soit applicable dans les conditions de production de la filière piscicole. Cette biotechnologie permettra de conserver et de régénérer les génomes des différentes populations de bar retrouvées dans différents milieux naturels ou des familles issues de multiples programmes de sélection et d'intérêt agronomique. À ce jour, seule la cryoconservation des cellules souches germinales permet de conserver et de restaurer l'ensemble des ressources génétiques d'une espèce. En effet, il n'est toujours pas possible de conserver les ovocytes ou les embryons chez les poissons téléostéens et la cryoconservation du sperme seule ne permet pas de conserver l'ADN mitochondrial qui est transmis à la descendance uniquement par la voie maternelle.

La transplantation des cellules souches germinales qui a déjà reçu une autorisation de la part du ministère MESR pour la truite (en 2014) et le zebrafish (en 2016) sera réalisée au moyen d'une piqûre dans la cavité abdominale d'embryons triploïdes. La triploïdisation préalable des embryons est une procédure d'élevage réglementaire qui permet de stériliser les animaux en empêchant la production de gamètes fonctionnels à l'âge adulte. Seuls les animaux receveurs triploïdes présentant des gonades colonisées avec les cellules souches germinales diploïdes transplantées pourront générer des gamètes fonctionnels.

Il a été démontré que les cellules souches germinales des animaux juvéniles sont bipotentes. Les cellules souches germinales issues de bar juvéniles mâles ou femelles permettront de générer des ovocytes et des spermatozoïdes selon le sexe de l'animal receveur. Ces gamètes seront ensuite utilisés pour générer des descendance par fécondation *in vitro* selon les procédures standards d'élevage.

Le projet cherchera à évaluer le stade de développement du bar le plus propice à la transplantation des cellules souches germinales. Il cherchera aussi à déterminer les stades de maturation sexuelle favorables au prélèvement des cellules souches germinales. Ainsi, les cellules spermatogoniales et ovogoniales souches seront préparées à partir de bars femelles et mâles immatures. Nous pourrions également prélever des ovogonies sur des femelles ovulées depuis moins de 1 à 2 mois.

Deux espèces seront utilisées comme receveurs, le bar pour réaliser des transferts intra spécifiques et le tilapia niloticus pour réaliser des transferts inter spécifique

Le nombre total d'animaux nécessaires au projet est de 3900.

Pour la transplantation intra spécifique bar/bar :

3400 larves de bars âgées de 15 à 90 jours post éclosion et 170 bars juvéniles ou sexuellement matures.

Pour la transplantation extra spécifique Bar/Tilapia niloticus

300 embryons de tilapia au stade éclos et 30 bars juvéniles ou sexuellement matures.

Le projet prend en compte la règle éthique des 3Rs

- Remplacer Il n'existe pas d'alternative *in vitro* à la collecte de cellules germinales souches à partir des gonades d'animaux donneurs malgré les recherches actuelles visant à générer ces cellules souches à partir des cellules souches embryonnaires ou de cellules somatiques adultes (peau). D'autre part, il n'est toujours pas possible de produire des spermatozoïdes *in vitro* et encore moins des ovocytes.

- Réduction Le nombre d'animaux transplantés est adapté au plus juste pour permettre d'évaluer le taux de succès de la transplantation et les performances de reproduction des animaux transplantés avec succès. Noter que dans ce projet, nous cherchons à évaluer la capacité des cellules souches germinales issues de femelles ovulées pour remplacer l'utilisation de femelles immatures qui possèdent des ovaires de plus petite taille et donc moins riches en cellules souches germinales. Nous espérons pouvoir ainsi diminuer le nombre de femelles ou de mâles à euthanasier pour collecter les cellules souches germinales.

- Raffiner Le protocole expérimental préconise l'anesthésie des animaux pour limiter le stress des animaux manipulés et la souffrance éventuellement induite par la piqûre d'injection des cellules souches germinales. D'autre part, nous procéderons rapidement à une euthanasie prématurée en cas de malformations ou de comportements anormaux des animaux transplantés traduisant un mal-être.

14943 Le cancer colorectal (CCR) reste toujours la troisième cause de décès par cancer dans le monde malgré les progrès réalisés ces dernières années. De plus, dans 50% des cas de CCR, une récurrence survient dans les 5 ans qui suivent l'arrêt du traitement. Ce phénomène est maintenant largement attribué aux cellules souches cancéreuses (CSC) qui sont résistantes aux traitements actuels. Il est donc important de trouver de nouvelles stratégies permettant d'éliminer les CSC afin d'améliorer l'efficacité des thérapies utilisées en clinique. Notre laboratoire collabore avec une Start-up qui développe des inhibiteurs d'une voie de signalisation importante pour les cellules souches cancéreuses dans le cancer du côlon (voies des MAP kinases).

Le projet que nous souhaitons réaliser s'effectuera en plusieurs temps

- l'évaluation du potentiel anti-tumoral *in vivo* des différents composés ayant montré une bonne efficacité *in vitro* afin de sélectionner la molécule la plus efficace.

- dans un deuxième temps, le composé le plus efficace sera testé en combinaison avec des chimiothérapies conventionnelles.

- dans un troisième temps, évaluer l'efficacité du meilleur composé sur un modèle murin de développement de métastases hépatiques (xenogreffe intrasplénique). Nous étudierons alors leurs effets sur l'apparition et la croissance de métastases.

Dans le cadre de la règle des 3R,

Réduire le nombre d'animaux a été réduit au minimum après calcul de l'échantillonnage nécessaire afin d'obtenir une puissance statistique satisfaisante et des mesures destinées à réduire la contrainte, la douleur

Raffiner la souffrance des animaux ont été prévues (enrichissement du milieu, suivi régulier des animaux, injection d'analgésiques en cas de douleur, ...).

Remplacer Nous avons montré l'efficacité *in vitro* des inhibiteurs sur différentes lignées de cellules de cancer du côlon et sélectionné les 5 composés les plus efficaces. La croissance tumorale et la dissémination métastatique sont des phénomènes complexes, mettant en jeu une multitude de paramètres, impossible à recréer *in vitro* d'où la nécessité de poursuivre le développement de ces candidats médicaments avec une étude préclinique chez la souris immunodéprimée, modèle permettant de réaliser des xénogreffes de cellules humaines.

Pour l'ensemble de ce projet, nous avons prévu un nombre de 400 souris sur une durée de 5 ans.

14944 Les troubles du spectre autistique (TSA) sont des pathologies neurodéveloppementales complexes caractérisées par des perturbations de la communication et de l'interaction sociale, des comportements stéréotypés et répétitifs, une hypersensibilité sensorielle, et sont souvent associés

à une déficience mentale (DM). Ces pathologies concernent aujourd'hui près de 1% des naissances. Des progrès considérables ont été accomplis dans la compréhension du déterminisme génétique et ont révélé une architecture génique sous-jacente très hétérogène. Cependant, les essais cliniques récents visant au développement de traitements permettant de prévenir ou d'atténuer les symptômes se sont avérés décevants. Face à ce problème de santé publique, les données de la littérature scientifique s'accordent sur la nécessité de rechercher de nouvelles molécules thérapeutiques et d'améliorer la compréhension des phénotypes.

Ces dernières années, différents groupes de recherche préclinique ont révélé l'importance d'une nouvelle cible thérapeutique le canal potassique calcium dépendant, BKCa. Nos travaux précédents ont démontré le potentiel thérapeutique d'une molécule ouvreuse du canal BKCa, le BMS-204352, chez un modèle de souris présentant des comportements autistiques (les souris Fmr1 KO). Face à l'hétérogénéité phénotypique et génétique des TSA, il est important d'élargir le panel de molécules visant ce canal et potentiellement utilisable en clinique. La stratégie adoptée dans notre projet est d'évaluer l'effet de ces molécules sur un large spectre de phénotypes précédemment caractérisés au sein de l'équipe moléculaires (non-présentés ici), comportementaux et électrophysiologiques. Nous élargirons également notre projet au phénotype d'hypersensibilité sensorielle. Différents modèles de souris seront utilisés dans ce projet Des souris transgéniques invalidées pour un gène (Fmr1, Shank3) et des lignées présentant des signes autistiques (BtBR, BALB/cJRj). Les analyses comportementales non-invasives permettront d'évaluer l'efficacité des différentes molécules sous plusieurs aspects cognitif, social, émotionnel et sensoriel. L'aspect sensoriel sera couplé à des analyses d'électrorétinogramme afin d'évaluer la réponse rétinienne des animaux d'une part, et à des protocoles permettant de tester la réponse nociceptive d'autre part. L'ensemble des molécules testées fera l'objet d'une étude in-vitro afin d'établir leur non-toxicité sur l'organisme. En cas de preuves formelles de non-toxicité et suite à nos précédentes expériences aucun dommage n'est attendu sur les animaux.

Le nombre maximum de souris envisagé pour ce projet est de 5208. Pour chaque procédure, les souris feront l'objet d'un suivi strict basé sur la grille de score adapté au modèle utilisé et les points limites précoces et adaptés seront établis en amont afin de détecter et d'éviter l'état de souffrance des animaux.

L'ensemble de ce projet a été préalablement évalué scientifiquement et fait l'objet d'un financement par une fondation américaine.

Une attention particulière sera accordée au respect de la règle des 3R

- Réduire les groupes expérimentaux contiendront 12 souris chacun, Afin de minimiser le nombre total d'animaux, chaque groupe utilisé dans la procédure 1 non invasive sera ensuite réutilisé dans les procédures 2, 3, 4, ou dans la 5. Cette étude se focalisera sur 10 molécules testées à 2 doses. Chaque expérience sera réalisée deux fois indépendamment afin d'assurer la validité statistique des résultats. Cependant, si une molécule s'avère inefficace lors de la procédure 1, elle sera abandonnée.

- Remplacer Le choix des molécules utilisables sera réalisé sur les bases de données obtenues à partir de cultures primaires de neurones. Sur la base de cette sélection, leur efficacité *in vivo* devra être testée chez la souris.

- Raffiner Les animaux seront suivis tout au long des procédures. Si des animaux présentent un début de signes de souffrance (point limite score égal ou supérieur à 2 selon la grille), ils seront mis à mort en concertation avec le responsable du projet.

14945 Les troubles du sommeil touchent 1/3 de la population générale, mais sont plus fréquents chez les personnes âgées et ont un retentissement plus important que dans le reste de la population. Ce problème affecte tous les pays industrialisés où de plus en plus de personnes souffrent d'un manque chronique de sommeil. Les modifications du mode de vie ont considérablement réduit le temps passé à dormir, creusant ainsi l'écart entre les besoins en sommeil et la durée du sommeil. Les troubles du sommeil déterminent un vieillissement accéléré, en particulier au niveau cérébro-

vasculaire, associé à une perte d'autonomie. Si la durée totale du sommeil compte, sa qualité et sa continuité importent tout autant.

En plus de sa fonction récupératrice, le sommeil est impliqué dans la régulation de nombreuses fonctions physiologiques, y compris les fonctions cognitives, la santé mentale, le métabolisme ou le système immunitaire. Ces troubles du sommeil peuvent également engendrer des troubles de l'humeur tels que la dépression et l'anxiété, des troubles métaboliques, comme l'obésité ou le diabète, et des maladies cardiovasculaires. Les troubles du sommeil jouent également un rôle important dans l'apparition ou l'aggravation d'autres maladies chroniques.

Parmi ces troubles du sommeil, le syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAOS), largement sous-diagnostiqué, touche la moitié de la population âgée. Il se caractérise par la répétition d'apnées avec hypoxie, et de micro-éveils. Les nombreux troubles cognitifs associés seraient autant liés à l'hypoxie répétée qu'aux micro-éveils (qui ne permettent pas d'atteindre un stade de sommeil profond). Les conséquences de l'hypoxie répétée et des micro-éveils sont additifs et peu étudiées. Les fragmentations vont altérer l'architecture cérébrale et la qualité du sommeil des individus. Les micro-réveils passent souvent inaperçus pour les personnes, cependant, comme la restriction du sommeil, ils affectent la mémoire, l'humeur, la vigilance et les performances psychomotrices. Ils augmentent également la somnolence, la fatigue et l'irritabilité. Dans ce contexte, la fragmentation du sommeil a des conséquences propres, mal connues. La fragmentation du sommeil aboutit globalement à une perte de neurones.

Le traitement de référence pour ces troubles du sommeil est la pression positive continue (PPC). L'un des principaux obstacles à un traitement par PPC est l'adhésion des patients à leur traitement. Beaucoup de patients rejettent, arrêtent ou utilisent de façon irrégulière ou sous-optimale la PPC, avec un taux d'abandon qui atteint jusqu'à 40 % la première année. Ceci met l'accent sur la nécessité d'offrir une alternative ou une combinaison de traitements qui dépend des efforts de recherche.

Le SAOS va entraîner un vieillissement cérébro-vasculaire accéléré qui va se caractériser par une altération de la paroi des vaisseaux. En condition « normale », l'endothélium des capillaires sanguins cérébraux joue un rôle essentiel dans la restriction des échanges entre le sang et le système nerveux central, constituant la Barrière Hémato-Encéphalique (BHE). La BHE protège ainsi le cerveau, lui amenant les éléments nutritifs nécessaires de façon active et sélective, participe à l'élimination active des déchets, faisant de cette barrière un élément à la fois physique, biologique, et métabolique. Son dysfonctionnement est associé à des troubles cognitifs et à des maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer (MA).

A ce jour, les recherches se sont concentrées essentiellement sur les effets de la composante hypoxique du SAOS. Les effets de la fragmentation du sommeil due aux micro-réveils restent largement inexplorés.

Nous faisons l'hypothèse que la fragmentation du sommeil jouerait un rôle majeur dans l'apparition de nombreuses complications neurologiques, en particulier chez les personnes âgées, en favorisant l'apparition de modifications cérébrales propices au développement de pathologies neurologiques.

Notre projet actuel est d'étudier les effets isolés de la disruption répétée du sommeil, donc sans hypoxie additionnelle, pour évaluer l'effet propre de la fragmentation du sommeil sur l'étanchéité de la BHE. Améliorer et approfondir les connaissances de l'effet d'une fragmentation du sommeil, sur la dérégulation du système nerveux autonome, passent par la réalisation et la validation d'un modèle de fragmentation du sommeil chronique sur un modèle de rongeurs. Pour cela, nous disposons d'un système de cage de fragmentation du sommeil innovant. Les cages disposent d'un plateau tournant entièrement automatisé. Les animaux seront soumis à une fragmentation du sommeil pendant 2 semaines. Nous mesurerons ensuite, par diverses techniques de biologie moléculaire, la présence de molécules préservant l'étanchéité de la BHE.

Notre étude se fera dans le respect de la règle des 3R

- Remplacer Afin d'étudier la dégradation des fonctions neurologiques ainsi que des voies moléculaires impliquées, il nous faut étudier le phénomène *in vivo*. Pour étudier les effets

neurologiques, il ne serait pas pertinent d'utiliser des animaux de classes phylogénétiques dites « inférieures ».

- Réduire Le nombre de rats nécessaire à nos travaux a été réduit au minimum sans compromettre l'interprétation statistique de nos résultats 4 animaux pour la mise en place de la procédure, 12 animaux par groupe (4 groupes) pour l'étude et 8 animaux pour les cas de dérives/problèmes expérimentaux sont prévus soit un total de 60 rats.

- Raffiner Outre l'attention générale portée à la qualité des méthodes d'anesthésie et d'analgésie pour tous les animaux, la vérification de leur bien-être sera quotidienne. Nous nous appuyons sur l'échelle d'évaluation des expressions faciales du rat afin de détecter tout signe de douleur.

14946 Le glyphosate est l'un des herbicides les plus largement utilisés dans le monde. Son utilisation extensive fait que sa substance active (SA) et son métabolite principal sont très largement retrouvés dans les eaux superficielles et souterraines. Si les propriétés physico-chimiques de la SA sont plutôt en faveur d'une certaine innocuité environnementale, des études récentes ont néanmoins révélé des effets toxiques chez des espèces non-cibles. De même, il semblerait que certaines substances ajoutées au glyphosate dans les formulations commerciales génèrent une toxicité supérieure à la SA seule. Les données disponibles à l'heure actuelle permettant d'évaluer le profil de sécurité sanitaire et environnementale du glyphosate divisent les experts dans un contexte où le renouvellement de son autorisation se pose au sein de l'Union européenne.

Le projet a pour objectif d'améliorer les connaissances sur l'impact du glyphosate et de ses adjuvants sur l'environnement, la santé et le bien-être des animaux. L'écotoxicité du glyphosate seul ou co-formulé sera évaluée sur plusieurs générations de truites arc-en-ciel (TAC). Des géniteurs F0 ont été exposés de manière chronique au pesticide dans une précédente procédure expérimentale menée en 2017. En novembre 2017, les géniteurs F0 ont engendré une génération F1 qui a elle-même été contaminée avec le pesticide durant les années 2018 et 2019, avant d'engendrer en Novembre 2019 une génération F2. Il est désormais question d'évaluer l'état de santé de cette génération F2 face à différents stress environnementaux, tels qu'une exposition chimique chronique ou encore une maladie virale. Pour ce faire, 7 800 TAC âgées de moins d'un an seront utilisées pour mener deux nouvelles procédures expérimentales. Trois mille alevins seront contaminés quotidiennement à 1 µg/L de glyphosate pendant 12 mois durant lesquels seront effectués des prélèvements invasifs de sang et d'organes cibles (branchies, foie, rate à raison de 240 poissons par mois pour mesure de plusieurs biomarqueurs d'exposition et d'effet). En parallèle, 4800 alevins seront contaminés à 1 µg/L de glyphosate pendant 3 mois puis infectés expérimentalement avec le virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse (vNHI) afin d'évaluer leur potentiel global de défense.

Ces deux procédures expérimentales seront menées dans le respect de la règle des 3R, à savoir la réduction du nombre d'animaux utilisés au seuil de la pertinence scientifique et statistique et le raffinement dans la gestion des lots de poissons. Les mesures de raffinement viseront à assurer des conditions optimales d'hébergement des animaux, i.e. un volume d'eau adapté avec une oxygénation suffisante en fonction de la biomasse, un rythme jour/nuit naturel, la présence de suffisamment de congénères pour exprimer un répertoire comportemental riche, une alimentation adaptée à leur stade de développement. Des mesures seront également prises pour réduire la douleur des individus pendant les procédures expérimentales. Le remplacement n'est en revanche pas envisageable, puisque qu'aucune méthode alternative n'a encore été développée pour réaliser ce type de travaux et que la truite arc-en-ciel est une espèce-modèle en écotoxicologie.

14947 Les gliomes sont des tumeurs cérébrales de très mauvais pronostic. La chirurgie constitue le traitement de première intention, cependant, du fait de leur caractère infiltrant, ces tumeurs récidivent après exérèse chirurgicale au niveau des berges d'exérèse dans presque 100% des cas. La présence de cellules cancéreuses résiduelles détermine en partie la localisation de la récurrence, le second facteur déterminant étant le remaniement du microenvironnement induit par l'acte chirurgical lui-même. De plus, la chimiothérapie, traitement régulièrement associé à la chirurgie, présente un manque d'efficacité lié à la présence de la barrière hémato-encéphalique qui

compromet une délivrance locale du traitement. Développer un système de délivrance localisée permettant de prévenir la prolifération des cellules cancéreuses « dormantes » après ablation de la tumeur pourrait modifier le caractère actuellement inévitable de ces récurrences tumorales.

Pour cette étude, le système de délivrance localisé se présente sous forme d'un hydrogel résorbable, chargé avec la molécule à délivrer. Les hydrogels sont réalisés à partir de polymères naturels dont la biocompatibilité *in vivo* a été évaluée lors d'une précédente étude réalisée chez le rat (demande d'expérimentation enregistrée sous la référence 20170327095240056v5 CE3810 380).

Etudier la biostabilité, la biodistribution, la biodégradation de ces hydrogels, la diffusion des molécules, ainsi que la réaction locale au contact du tissu cérébral justifie le recours à un modèle animal en l'absence d'un modèle alternatif exploitable. Les objectifs visés dans ce projet nous conduisent à utiliser les miniporcs en raison des besoins liés à la taille de l'encéphale et à la chirurgie.

Nous souhaitons donc réaliser sur ce modèle une implantation de ces hydrogels. Une cortectomie sera réalisée afin d'implanter l'hydrogel directement dans la cavité corticale, les hydrogels chargés ou non avec une drogue seront testés. Dans ces protocoles, le projet prévoit le recours à un total de 15 porcs Göttingen. Ces hydrogels seront implantés pendant une durée de 13 semaines. Le nombre d'animaux a été réduit au minimum nécessaire, en considérant que chaque animal est son propre contrôle (hémisphère controlatéral utilisé comme contrôle chirurgical). Cette démarche permet de réduire le nombre de porcs utilisés sans compromettre la validité des expériences menées et en conservant un nombre d'animaux suffisant. Enfin, tous les efforts sont consentis pour détecter et prendre en charge efficacement toute forme de souffrance des animaux, leur état de santé sera surveillé et évalué hebdomadairement au cours de l'expérience et les animaux bénéficieront d'une surveillance quotidienne et de traitements adaptés (antalgie, anesthésie).

14948 Dans un souci de raffinement des enseignements de physiologie animale, nous avons fait l'acquisition de système téléométriques de gilets connectés pour le monitoring non-invasif des paramètres cardio-respiratoires chez le rat. Ces systèmes permettent de réaliser de façon totalement non invasive et non contraignante pour l'animal l'enregistrement de l'électrocardiogramme, de la respiration et de l'activité locomotrice spontanée chez le rat vigile et libre de ses mouvements. Nous nous proposons d'utiliser ce système pour réaliser des enregistrements qui puissent être exploités dans le contexte des enseignements de physiologie animale. Dans ces enseignements, sont traités les principaux mécanismes physiologiques qui permettent l'adaptation des organismes à des variations des conditions environnementales telles que par exemple les températures extrêmes (environnement désertique ou polaire) ou l'adaptation à la haute altitude (manque d'oxygène également appelé « hypoxie »). Les adaptations à l'environnements constituent une formidable approche pour expliquer aux étudiants les mécanismes physiologiques qui permettent la survie, l'adaptation et la colonisation de niches écologiques variées. Nous souhaitons dans ce contexte

1) Évaluer et valider, en conditions réelles d'utilisation, la possibilité de réaliser des enregistrements cardio-respiratoires avec ces gilets connectés. L'utilisation de ses systèmes permet une mesure totalement non invasive des paramètres cardio-respiratoires (c'est-à-dire sans chirurgie préalable d'où un raffinement notable) et sans interaction directe de l'expérimentateur avec l'animal.

2) Réaliser une banque d'enregistrements physiologiques qui puissent être ré-exploités en enseignements pratiques et dirigés (traitement du signal, interprétation des données physiologique, construction de courbes, ...) permettant de réduire en enseignement le recours à l'utilisation des animaux.

3) Réaliser un film qui nous permettrait de démontrer aux étudiants l'utilisation de ces systèmes téléométriques et de contextualiser la réutilisation éventuelle des enregistrements en enseignement.

Nous souhaiterions pouvoir réaliser une preuve de concept sur un nombre limité d'animaux (10 rats). Les enregistrements seront réalisés en condition normale, en situation d'hypoxie modérée

reproduisant une exposition à une altitude simulée de 3500m et en réponse à l'administration d'un médicament, le doxapram, connu pour stimuler la respiration.

Conformité à la règle des 3 R (Remplacement, Raffinement, Réduction) :

- S'agissant de l'étude du fonctionnement intégré de l'organisme animal (régulations cardio-vasculaires et de respiratoires, il nous est impossible d'utiliser des méthodes *in vitro* et il est nécessaire de recourir à une expérimentation sur animal entier.
- Le nombre d'animaux nécessaire à cette étude a toutefois été calculé au plus juste (10 rats, dont 5 rats mâles et 5 rats femelle afin de pouvoir comparer leur réponse et de mieux en compte le facteur "sexe").
- L'utilisation de gilets connecté permet de réaliser de façon totalement non invasive et non contraignante pour l'animal l'enregistrement de l'électrocardiogramme, de la respiration et de l'activité locomotrice spontanée chez le rat vigile et libre de ses mouvements (« Raffinement » des procédures).
- L'exposition à une hypoxie modérée ou l'administration de doxapram ne sont pas délabrantes et n'ont pas de conséquences attendues néfastes pour l'animal. Les animaux pourront donc être proposés pour réutilisation à l'issue dudit protocole (objectif de "Réduction").
- L'utilisation des enregistrements réalisés au cours de ce protocole permettra par leur ré-exploitation avec les étudiants de limiter le recours à l'expérimentation animale pour les enseignements (objectif de « Réduction »). Ces enregistrements pourront être utilisés pour illustrer d'autres enseignements tels ceux de physiologie cardio-respiratoire et ceux de pharmacologie en niveau Licence (Bac+3) comme en Master (Bac+5).
- Les conditions d'hébergement choisies sont adaptées aux besoins des rats physiologiques et comportementaux (température, enrichissement du milieu de vie, hébergement en cages collectives,).

14949 La déficience en acides aminés indispensables, qu'elle soit métabolique (traitement au paracétamol) ou nutritionnelle (régimes déséquilibrés) a des conséquences néfastes pour les tissus, pouvant conduire à une réduction de la masse et de la fonction du muscle squelettique. Préserver la masse musculaire tout au long de la vie est un objectif de santé publique, afin de limiter la perte d'autonomie des personnes âgées, dans un contexte de vieillissement de la population (dépendance). La voie de signalisation eIF2 α -ATF4 joue un rôle clé dans le processus d'adaptation des cellules à une carence en acide aminé indispensable. Cette voie de signalisation peut être activée par plusieurs kinases dont GCN2 qui est sensible à la déficience en acides aminés indispensables, et PERK qui est activée par le stress du réticulum endoplasmique, pouvant découler d'un stress oxydant.

La méthionine et la cystéine sont les deux acides aminés soufrés contenus dans les protéines. La méthionine est indispensable, c'est-à-dire qu'elle doit être fournie par l'alimentation. La cystéine est conditionnellement indispensable, c'est-à-dire qu'elle doit être fournie par l'alimentation lorsque sa synthèse endogène à partir de méthionine n'est pas suffisante pour satisfaire tous les besoins de l'organisme. De plus, la cystéine est utilisée pour la synthèse du glutathion, le principal anti-oxydant intra-cellulaire. Une déficience en acides aminés soufrés, d'origine métabolique ou nutritionnelle, pourrait donc activer la voie de la voie de signalisation eIF2 α -ATF4. Cette activation pourrait résulter de l'activation de la kinase GCN2 mais également de la kinase PERK en réponse au stress oxydant produit par la chute du glutathion.

L'objectif du projet est d'analyser le rôle de la voie de signalisation eIF2 α -ATF4 dans la réponse à un manque d'acides aminés soufrés induit par la prise de paracétamol ou un régime carencé et de déterminer l'implication respective de GCN2 et de PERK selon les tissus. Les expériences incluront plusieurs lignées de souris des souris non modifiées génétiquement, des souris transgéniques bioluminescentes possédant un gène rapporteur de l'activité d'ATF4, des souris dont le gène GCN2 est inactivé et des souris ayant ces deux modifications génétiques. Elles seront traitées ou non au paracétamol et nourries avec des régimes contenant des quantités variables de méthionine et de

cystéine. Une approche complémentaire consistera à inhiber GCN2 par administration d'un inhibiteur pharmacologique de cette kinase.

Les résultats obtenus permettront ensuite d'optimiser les apports en acides aminés soufrés lors de prise de paracétamol, afin de limiter les effets néfastes d'un tel traitement qui est très fréquent chez les personnes âgées pour traiter les douleurs chroniques.

Ce projet comporte l'utilisation de plusieurs lignées de souris, pour un nombre maximal de 1455, sur une période de 5 ans. Les expériences seront réalisées selon la réglementation 2010/63/UE et selon la règle des 3R (remplacer, réduire, raffiner). L'expérimentation animale est nécessaire pour le développement du projet car il repose sur une approche intégrée prenant en compte les interactions entre les tissus et les organes. Cette approche intégrée est impossible avec les méthodes de recherches *in vitro*. Le projet sera développé pas à pas et le nombre de souris utilisées pour chaque expérience sera calculé au minimum en fonction de la variabilité des paramètres d'intérêt de chaque expérience et de l'effet attendu. Les procédures sont de sévérité légère ou modérée pour la mise en cage individuelle. Afin de limiter au maximum la privation de congénères, les souris auront à leur disposition un enrichissement dans la cage.

14950 Le cerveau est un tissu richement vascularisé lui permettant d'accéder aux éléments nécessaires au bon développement et fonctionnement de ses cellules. Par conséquent, les réseaux vasculaire et neuronal se connectent rapidement au cours du développement entraînant une interdépendance qui n'est pas sans conséquence. La circulation sanguine est effectivement source de molécules toxiques qui peuvent infiltrer le cerveau et lui être délétère. Pour éviter cela, deux types de barrières protectrices existent séparant le sang de l'organe. A l'état physiologique, elles assurent l'homéostasie cérébrale mais il arrive qu'elles puissent être altérées notamment dans le cas de pathologies périnatales. La période périnatale est effectivement une période critique de plasticité au cours de laquelle le nouveau-né peut-être exposé à divers stress tels qu'une inflammation cérébrale due à des infections périphériques ou encore des épisodes d'hypoxie (naissance prématurée, privation brutale d'oxygène...). Combinés, ces stress sont à l'origine de séquelles neurologiques durables.

Nous étudions actuellement dans l'équipe l'effet de ces stress périnataux sur l'intégrité des barrières sang-cerveau chez le rat. Le projet de recherche fondamentale qui fait l'objet de cette demande consistera sur une durée de 3 ans à étudier les conséquences de ces stress périnataux sur le développement des réseaux neuronaux et vasculaires du cortex et les interactions entre ces deux réseaux pour mieux comprendre la mise en place des séquelles neurologiques à long terme. L'impact d'un agent neuroprotecteur, la N-acétylcystéine (NAC), sur les lésions observées sera ensuite testé.

Nous procéderons au marquage de populations précises de neurones corticaux ainsi que les vaisseaux cérébraux environnants afin d'étudier leur réponse face à ces stress ainsi que leur récupération au cours du temps. Pour cela, nous utiliserons une approche innovante permettant le marquage d'un faible nombre de neurones et donc d'explorer en détail leurs morphologies au cours du temps. Nous procéderons à un marquage concomitant pour révéler le réseau vasculaire et étudier sa réponse à ces stress. Nous pourrons sur un seul et même animal marquer les réseaux neuronaux et les vaisseaux sanguins pour analyser le tout simultanément par des approches histologiques poussées.

Cette procédure sera appliquée chez le rat afin de pouvoir corrélérer les altérations du développement neurovasculaire à l'altération de l'intégrité des barrières sang-cerveau. Pour des raisons techniques, cette espèce est le modèle animal de choix permettant la mesure de perméabilité des barrières. Cependant dans un premier temps un groupe de souris sera utilisé pour 2 raisons

- Une personne qualifiée fournira le geste chirurgical propre à la technique expérimentale permettant le marquage des neurones (électroporation *in utero*),
- Les données seront utilisées pour compléter une étude en cours basée sur un autre modèle d'encéphalopathie périnatale (hypoxie seule chez la souris).

Nous estimons qu'un nombre total de 90 souris et 240 rats sera nécessaire pour accomplir ce projet de 3 ans. Tous les animaux seront mis à mort immédiatement après ces stress périnataux (8 jours postnatal, P8) ou suite à un délai de plusieurs semaines (P30) afin de récupérer les tissus après une période de récupération.

Procédure 1 (classe modérée) Nous marquerons tout d'abord des populations précises de neurones par électroporation *in utero*. C'est une procédure utilisée dans de très nombreux laboratoires de recherche, et donc optimisée afin de limiter son impact sur le bien-être animal. Les protéines fluorescentes exprimées par cette approche n'entraînent aucun effet néfaste sur les animaux.

Procédure 2 (classe légère) L'objectif de cette procédure est d'obtenir un modèle de pathologies périnatales proche de la clinique. Pour cela les animaux sont soumis après la naissance à une période d'hypoxie combinée à une inflammation. Cette dernière sera induite par l'injection relativement faible en intra-péritonéal d'un composant de la paroi bactérienne au 8ème jour après la naissance. Cette injection permet de mimer une réponse inflammatoire sans impliquer de réelle infection ce qui est néanmoins suffisant pour induire des dysfonctionnements au niveau des interfaces sang/cerveau. Nous combinerons donc cette inflammation à une période hypoxique courte (6% d'O₂ pendant deux heures) pour mimer un manque bref et brutal d'oxygène. Les animaux seront ensuite euthanasiés 14 heures après la période hypoxique ou suite à un délai de plusieurs semaines (P30).

Remplacement Bien que des modèles *in vitro* de barrières protectrices existent, ils ne permettent pas d'étudier de façon concomitante la mise en place des réseaux neuronaux. En effet, la maturation des neurones ainsi que leur connectivité (entre eux mais aussi avec le réseau vasculaire environnant) ne peuvent être étudiés qu'*in situ*, dans un cerveau entier. Il est donc nécessaire d'utiliser un modèle animal pour étudier la pathologie.

Réduction Notre approche expérimentale nous permet d'analyser plusieurs dizaines de neurones ainsi que leur réseau vasculaire sur un même animal. La méthode d'échantillonnage utilisée permet non seulement un échantillonnage homogène de notre région d'intérêt, mais aussi l'utilisation des mêmes cerveaux pour des marquages immunohistochimiques, permettant de minimiser le nombre d'animaux nécessaire à ce projet.

Il existe dans le laboratoire un système de préservation jusqu'à plusieurs années de toutes les séries de coupes non utilisées. Cette banque de tissus permet d'optimiser sur le long terme l'utilisation du tissu tout en réduisant le nombre d'animaux utilisé.

Nous limiterons le nombre d'animaux en réalisant les expérimentations sur des animaux issus d'une même portée lors de comparaisons de groupes pour limiter les variations interindividuelles.

Raffinement De nombreuses actions de raffinement seront mises en place lors des procédures décrites dans ce projet. Toute procédure de chirurgie (Procédure 1) sera accompagnée d'utilisation d'anesthésiques et d'analgésiques, et d'un suivi journalier des animaux afin de détecter et traiter immédiatement tout signe d'inconfort.

14951 La sclérose latérale amyotrophique est une maladie neurodégénérative de l'adulte pour laquelle nous ne disposons pas de molécule thérapeutique efficace. Les deux thérapeutiques existantes, le Riluzole et l'Edaravone, montrent en effet une efficacité modérée.

L'objectif de l'étude est d'évaluer l'effet métabolique et clinique d'un nouvel anticorps monoclonal dirigé contre la protéine CD38 sur un modèle murin de sclérose latérale amyotrophique.

Pour atteindre cet objectif, nous utiliserons des souris génétiquement modifiées porteuses d'une forme mutée du gène SOD1 codant la protéine superoxyde dismutase 1.

Les souris seront réparties en plusieurs groupes expérimentaux :

-un groupe de 24 souris transgéniques traitées par la solution véhicule (contrôle 1; 24 dont 18 pour une étude comportementale et 6 pour une étude histologique)

-un groupe de 18 souris transgéniques traitées avec un anticorps Isotype (contrôle 2; 18 pour une étude comportementale; pas d'étude histologique dans ce groupe)

-un groupe de 48 souris transgéniques traitées avec l'anticorps B8 (répartis en 2 groupes de 24 souris, un groupe injecté en pré-symptomatique, l'autre en post-symptomatique; Dans chaque groupe de 24, 18 pour une étude comportementale et 6 pour une étude histologique) soit, 90 souris au total.

Plusieurs éléments sont mis en oeuvre afin de suivre au mieux la règle des 3R :

-Remplacement ce nouvel anticorps développé très récemment dans le cadre des pathologies neurodégénératives montre des effets très intéressants sur des modèles cellulaires. Aujourd'hui, nous souhaitons déterminer le bénéfice thérapeutique de cet anticorps *in vivo* en conduisant une étude comportementale sur des animaux.

-Réduction : sur la base d'une analyse statistique et de la bibliographie sur l'utilisation de ce modèle murin dans la SLA, le nombre de groupes de souris a été optimisé et le nombre d'animaux par groupe a été réduit au maximum.

-Raffinement : l'enrichissement dans les cages d'hébergement sera systématique (Sizzle nest). Les animaux seront surveillés chaque jour pendant toutes les semaines de l'étude. Ils seront surveillés toutes les 30 min pendant 2h après injection de l'anticorps et des critères de point d'arrêt anticipé codifié. La prise en charge d'une douleur potentielle due au traitement conduira à un arrêt du traitement et à l'intervention d'un animalier en vue de réduire cette douleur.

14952 La peau est un organe dynamique. Elle possède un rôle de protection, d'échange métabolique mais joue également un rôle esthétique et social. Toute agression cutanée est à l'origine de phénomènes de remaniements nommés « cicatrisation » qui ont pour objectif d'aboutir à une restitution optimale de son intégrité. Cette cicatrisation est un mécanisme complexe, passant par différentes phases qui se succèdent avant d'aboutir à une cicatrice définitive en quelques mois. Celle-ci dépend non seulement du type de traumatisme et de sa prise en charge, mais également de facteurs intrinsèques à chaque individu, tels l'ethnie, l'âge, le mode de vie, les maladies et d'autres facteurs encore qui demeurent inconnus.

La chirurgie Plastique prend en charge les patients porteurs de plaies. Les plaies avec perte de substance cutanée, quelquefois étendues comme dans les brûlures, nécessitent souvent une greffe de peau. Cette greffe permet la cicatrisation mais nécessite d'être prélevée sur le patient lui-même. Lors de la réalisation d'une greffe de peau mince ou semi épaisse dermo-épidermique, la zone choisie pour le prélèvement va cicatriser spontanément en laissant une cicatrice visible. Dans le cas d'une plaie étendue comme une brûlure grave, la greffe de peau est le traitement de référence mais les sites de prélèvement de greffe peuvent être restreints imposant quelquefois plusieurs prélèvements pour parvenir à la cicatrisation.

L'impression 3D consiste en la fabrication additive de fines couches de matériels et leur assemblage pour former une structure en 3 dimensions. Cette approche industrielle permet d'apporter une plus-value grâce à l'automatisation et la standardisation des méthodes de production, tout en pouvant être mis à disposition des professionnels de santé au sein même de structures hospitalières.

L'objectif principal de cette étude vise à évaluer la greffe de peau fabriquée par impression 3D chez un modèle murin.

Nous avons déterminé à partir d'études préalablement réalisées que 36 souris immunodéficientes seront nécessaires et suffisantes pour mener à bien ce projet. L'utilisation de l'imagerie isotopique permettra de faire un suivi longitudinal, multiparamétrique et quantitatif non invasif du processus de cicatrisation et ainsi de réduire le nombre d'animaux nécessaire (Réduction). Ce projet étant proposé par des chercheurs, industriels et des cliniciens, il a été élaboré de manière à ce qu'il soit transposable à l'Homme.

Pour ce type de projet, il n'existe actuellement aucune méthode alternative à l'expérimentation animale (Remplacement). L'usage de biothérapie nécessite une évaluation de l'efficacité et des risques sur un modèle biologique vivant avant transposition à l'homme.

Les souris seront hébergées par 5 en portoirs ventilés durant la période d'acclimatation pour diminuer leur stress et permettre les interactions sociales. Chaque cage sera agrémentée de tunnel rouge afin d'amener un enrichissement aux souris et de les stimuler. Elles auront à disposition de

la nourriture et de l'eau à volonté, le cycle jour nuit (12h/12h) sera respecté et la température et l'hygrométrie ambiante seront contrôlées. Toutes les manipulations seront réalisées par du personnel formé afin d'optimiser le bien-être des souris et l'obtention de résultats positifs. La chirurgie se fera sous anesthésie générale avec une analgésie pré et post-opératoire. Les imageries prévues seront réalisées sous anesthésie également. De plus, la douleur et le bien-être des souris seront évalués quotidiennement tout au long de l'expérimentation afin d'adapter leur prise en charge en fonction. Si une souffrance sévère irréversible était objectivée, une mise à mort du rongeur sera réalisée sans délai. (Raffinement)

Les résultats de ce projet pourraient permettre d'envisager la réalisation d'un essai clinique de phase I chez l'homme.

14953 Contexte scientifique

La pression artérielle et son corollaire la pression hydrostatique interstitielle jouent un rôle majeur dans les équilibres et les communications cellulaires.

Dans le tissu osseux, cet équilibre se fait via la pression intra-médullaire et la modulation de cette pression par la membrane périostée couvrant toute la surface osseuse, elle-même au contact du muscle et de sa vascularisation.

Des études préalables sur les os porteurs de l'homme et du rongeur, modifiant le jeu des pressions négativement par la microgravité ou positivement par l'exercice physique, ont comme résultante soit la perte osseuse, soit le gain osseux.

Notre laboratoire a déjà publié sur l'impact des modifications hormonales, métaboliques ou mécaniques sur le remodelage vasculaire qui accompagne ou anticipe le remodelage osseux avec des modifications de la perfusion vasculaire intramédullaire.

Notre objectif est de mieux comprendre la dynamique hydrostatique et plasmatisque, avec la cinétique du couplage de la formation et de la résorption osseuses sur toutes les interfaces entre l'os, la moelle et les muscles. Nous cartographierons précisément les dynamiques de ces interfaces sur tibia et fémur entiers, avec l'utilisation de marqueurs de formation osseuse et de colorants intravitaux.

Pour cela, nous utiliserons deux modèles animaux de souris, un premier modèle de souris mâles et un deuxième modèle de souris femelles ovariectomisées reproduisant la perte osseuse (ostéoporose) de la femme après la ménopause, conséquence de la carence en œstrogène. Le modèle d'ovariectomie chez la souris étant un modèle recommandé de vieillissement osseux accéléré. Nous évaluerons longitudinalement les paramètres osseux des tibias au scanner à rayon X de ces souris.

Pour les mâles et les femelles, une partie de ces souris sera mise dans une machine à gravité augmentée (accélération $2G = 2$ fois la gravité terrestre), afin d'étudier la réponse du squelette dans un environnement d'augmentation de la pression artérielle et hydrostatique des membres. En effet chez l'homme, dans les tests de gravité augmentée chez les pilotes d'avion il y a une augmentation de la pression artérielle et hydrostatique dans le sens du vecteur gravitaire. Inversement, en microgravité, la perte osseuse est associée à une baisse importante de la pression artérielle des membres inférieurs, et à un gain osseux dans le crâne soumis à une augmentation de la pression artérielle.

Notre hypothèse est d'une part d'observer chez les mâles, à différents âges, des modifications des dynamiques hydrostatique, plasmatisque et osseuse (formation/résorption), après 1 semaine et 3 semaines de gravité augmentée et d'autre part chez les femelles de prévenir la perte osseuse liée à l'ovariectomie par un régime de gravité augmentée, en évaluant les dynamiques hydrostatique, plasmatisque et osseuse (formation/résorption), 1 semaine et 3 semaines après ovariectomie.

La contrainte par gravité augmentée est déjà utilisée en routine au laboratoire et a déjà montré chez des souris contrôles des effets anaboliques osseux.

La présente demande concerne d'une part, l'utilisation de 96 souris mâles de 3 âges différents. Nous utiliserons 5 génotypes différents, soit $5 \times 96 = 480$ souris mâles

D'autre part nous utiliserons 48 femelles âgées de 3 mois par génotype. Nous utiliserons 5 génotypes différents de souris, soit $48 \times 5 = 240$ souris.

Donc un total de souris mâles et femelles $480 + 240 = 720$ souris

La mise en place de ce protocole respecte les objectifs des 3R.

Réduction : Ce nombre ne peut être diminué sans risque de mettre en péril l'interprétation statistique

Remplacement : Les expériences proposées avec des injections intra-vitales ne peuvent utiliser un autre modèle.

Raffinement : Enfin chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité, par du personnel qualifié, pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. Les animaux sont sous surveillance vidéo permanente dans la machine d'augmentation gravitaire afin de pouvoir intervenir si un point limite est observé. Par ailleurs, ils sont hébergés en groupes dans un environnement enrichi (copeaux, matériel de nidification, bâtonnets à ronger). Enfin, l'eau et la nourriture sont mises à disposition "ad libitum".

14954 Les petits ruminants (brebis et chèvres) jouent un rôle majeur dans les sociétés rurales des pays méditerranéens avec des impacts sur l'économie, l'environnement, et sur le maintien des populations rurales. Les systèmes d'élevage de petits ruminants sont généralement très bien adaptés aux conditions locales mais sont mis à l'épreuve aujourd'hui par le changement climatique. Le projet proposé ici, qui est focalisé sur les chèvres, fait partie d'un projet international qui a pour but de mettre en place des outils d'aide à la décision pour les éleveurs afin de leur permettre d'adapter leur système d'élevage aux nouvelles conditions. Pour construire de tels outils nous avons besoin de mieux comprendre la capacité d'adaptation des chèvres et les facteurs favorisant cette adaptation.

Nous utiliserons des tests avec changements de l'alimentation pour quantifier la capacité d'adaptation des chèvres. Ces tests consistent à remplacer l'aliment normal par de la paille pendant deux jours, ce qui représente une perturbation de courte durée pour un ruminant, espèce qui est adaptée à des aléas d'alimentation au pâturage. Ces tests seront réalisés sur des animaux adultes en lactation qui seront suivis avant, pendant, et après chaque test (17 jours de mesure au total par test) avec des mesures de comportement, d'ingestion, de performance et de métabolisme via des échantillons de lait (non-invasif), des prises de sang et l'utilisation de capteurs non-invasifs comme des accéléromètres pour enregistrer les mouvements des chèvres.

La capacité d'adaptation des animaux est un caractère complexe qui intègre de multiples mécanismes physiologiques. De fait, il n'existe pas de méthode pour l'évaluer sans avoir recours aux animaux. Pour mieux comprendre cette capacité d'adaptation, et ensuite pouvoir la prédire, nous proposons d'évaluer la variabilité de cette capacité d'adaptation, entre chèvres adultes ayant différents profils de croissance. Ainsi les chèvres seront issues d'accouplements utilisant des boucs identifiés comme produisant soit des filles avec une durée de vie plus longue que la moyenne, soit des filles avec une durée de vie plus courte que la moyenne observée dans la population en élevage sur le terrain. Pour comprendre l'effet des aléas climatiques pendant la croissance de ces animaux, chaque groupe génétique sera alimenté à volonté pendant la croissance avec, soit une ration légèrement supplémentée par rapport aux recommandations, soit la même ration non supplémentée. Ces quatre groupes de chèvres seront suivis depuis leur naissance jusqu'à leur deuxième lactation. Ces chèvres seront hébergées en groupes dans des parcs conformes à la réglementation. A part les périodes de tests où les chèvres seront hébergées sur caillebotis, les chèvres seront logées sur paille.

Pour avoir suffisamment d'animaux en deuxième lactation, permettant d'effectuer les tests statistiques nécessaires au projet tout en respectant la règle des 3Rs (20 chèvres par combinaison de groupe génétique et alimentation en croissance), il est nécessaire de prendre en compte une diminution du nombre d'animaux initial avec le temps liée au fait que la réussite à chaque mise à la reproduction n'est pas de 100%. Ainsi, les quatre groupes de chèvres seront constitués initialement à partir de 75 chevrettes par an au sevrage, soit 300 animaux au total sur quatre périodes de mises bas. Afin de respecter la règle de raffinement des 3R, l'état général des animaux sera contrôlé

plusieurs fois par jour et il sera en particulier vérifié que tous les animaux s'alimentent correctement. Nous avons mis au point un dispositif expérimental performant de mesure d'ingestion sur caillebotis où le confort des animaux a été particulièrement pris en compte car c'est un aspect crucial pour la fiabilité des données de capacité d'adaptation. Tous les animaux retourneront dans l'élevage à la fin des procédures.

14955 La dépression est une maladie chronique et invalidante dont les retombées socio-économiques et l'impact sur les familles des malades sont considérables. Elle représente aujourd'hui la pathologie mentale la plus fréquente et sera d'ici 2030 une des pathologies les plus importantes au niveau mondial en termes de santé et de société. En plus du stress chronique, la douleur chronique est un facteur déterminant dans le développement de la dépression puisque près de 50% des patients souffrant d'une douleur chronique présentent également un trouble dépressif. La douleur chronique, définie comme une douleur persistante et récurrente, qui dure au-delà de 3 mois et accompagnée d'une détérioration significative et progressive des capacités fonctionnelles et relationnelles du patient dans ses activités de la vie journalière, se décline en plusieurs sous-types. Parmi ces sous-types, nous nous intéressons plus particulièrement aux douleurs inflammatoires et chirurgicales et à la douleur neuropathique, qui est liée à une lésion ou une maladie affectant le système somato-sensoriel. Grâce à l'utilisation de modèles animaux il est aujourd'hui clair que le décours temporel des comportements anxieux et/ou dépressif associés à une douleur chronique est hautement dépendant du type de douleur chronique considéré. Sur la base de ce constat nous imaginons que cette variabilité observée peut révéler des différences dans les mécanismes sous-jacents la comorbidité entre douleur chronique et comportements anxio-dépressifs. Nos derniers résultats, obtenus dans notre modèle murin de douleur neuropathique, semblent indiquer un rôle prépondérant de l'habénula latérale (HbL) dans les comportements anxio-dépressifs associés à la douleur. En effet, suite à une étude longitudinale d'imagerie par Résonance Magnétique (IRM), nous avons vu des changements dans la connectivité fonctionnelle de l'HbL avec des structures impliquées dans la douleur, telles que le cortex préfrontal médian (mPFC), y compris le cortex cingulaire antérieur, l'insula et l'aire tegmentale ventrale (VTA). Dans ce contexte, nous étudierons l'effet de la manipulation de l'HbL sur les comportements anxio-dépressifs ainsi que sur le seuil nociceptif. Au regard de nos résultats et de la littérature, nous pensons que l'HbL et ses connectivités anatomiques contribuent non seulement à la mise en place de comportements anxio-dépressifs dans la douleur neuropathique, mais aussi dans d'autres types de douleurs chroniques (douleur inflammatoire et chirurgicale). Grâce à cette étude nous espérons déceler un mécanisme commun à ces trois types de douleurs, ce qui pourrait ouvrir de nouvelles pistes dans la recherche de traitements des douleurs chroniques et de leur composante émotionnelle et affective.

Le projet nécessitera 1470 animaux et sera conduit en respectant la règle des 3R visant à réduire le nombre d'animaux ainsi qu'à optimiser les procédures. Seules les souris mâles seront étudiées dans le cadre de ce projet, mais nous prévoyons de conduire une analyse dédiée spécifiquement aux souris femelles dans un futur proche.

Remplacer Au vu de notre thématique d'étude, il nous est impossible de remplacer notre modèle *in vivo* par un modèle *in vitro* ou *in silico*. La caractérisation de la douleur et de sa composante émotionnelle et affective nécessite une observation comportementale, uniquement possible chez l'animal vivant et vigile.

Réduire les expériences seront cependant réalisées avec la volonté de réduire au minimum le nombre d'animaux par condition expérimentale, mais toujours dans l'optique d'obtenir le maximum d'information scientifique par test. Ainsi, au regard des données de la littérature et de la variabilité phénotypique individuelle, les groupes expérimentaux explorant les comportements de type anxio-dépressif liés aux douleurs chroniques seront constitués de 20 souris. Toujours dans l'idée de diminuer au maximum le nombre d'animaux utilisés certaines des procédures expérimentales feront partie d'un enchaînement et utiliseront les mêmes animaux, ce qui en réduira grandement l'effectif. Pour cette raison une même cohorte d'animaux sera étudiée et caractérisée au niveau comportemental et émotionnel, puis fera l'objet d'investigations cellulaires et moléculaires.

Raffiner Les animaux sont hébergés en animalerie dont la température, l'humidité et le cycle jour/nuit sont contrôlés, nourriture et boisson sont disponibles ad libitum. Ils seront hébergés en cohorte de 4 individus pour respecter leurs besoins sociaux. Des carrés de coton seront placés dans la cage pour favoriser la nidation, et des barreaux de bois à ronger pour limiter les comportements d'agressivité. Nous travaillerons en cycle jour/nuit inversé (lumière allumée de 21h à 9h), pour éviter les manipulations durant le temps de sommeil des animaux et ainsi diminuer le stress. Les animaux seront observés tous les jours et leur comportement sera suivi afin de déceler tout signe d'inconfort ou de stress. Les procédures invasives seront réalisées sous anesthésie et analgésie pré-, per- et post-opératoire. La température corporelle de l'animal sera maintenue grâce à un tapis chauffant thermostaté tout au long de la procédure. La douleur sera évaluée en post-opératoire grâce à une fiche d'évaluation objectivée permettant d'identifier des points limites parfaitement adaptés qui permettront d'interrompre la procédure pour limiter la souffrance animale. En cas de signes de souffrance de l'animal, des soins, une administration d'antalgique ou d'anti-inflammatoire, une séparation (blessures entre congénères) seront réalisés après concertation avec le vétérinaire, la Structure chargée du Bien-Etre des Animaux

(SBEA) et/ou le personnel zootechnique de l'institut. Si de nouvelles approches moins stressantes ou douloureuses pour l'animal venaient à être mises au point après le début de ce projet, une concertation avec la SBEA de l'institut pourra être réalisée afin d'intégrer ces nouvelles pratiques dans nos procédures.

14956 L'insuffisance cardiaque constitue un problème majeur de santé publique dans les pays industrialisés. En Europe, selon la Société Européenne de Cardiologie, 15 millions de patients sont atteints d'insuffisance cardiaque. Des médicaments sont actuellement disponibles comme les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) ou les antagonistes des récepteurs AT1, les bloqueurs des récepteur β -adrénergiques et les diurétiques. Malgré l'arsenal thérapeutique, le taux de mortalité reste élevé 40% des personnes diagnostiqués en insuffisance cardiaque sévère décèdent dans les 5 ans. Il existe donc toujours une nécessité de découvrir de nouveaux traitements visant de nouvelles cibles et surtout avec un mode d'action différent de ceux déjà établis. Deux types de traitement prometteurs sont actuellement en cours de développement dans le laboratoire les analogues de l'apéline métaboliquement stable (PROJET 1), et un nouvel inhibiteur de l'aminopeptidase A à action centrale (PROJET 2). PROJET 1 L'apéline est un neuropeptide qui, en agissant sur son récepteur, va induire une dilatation des vaisseaux, une élévation de l'élimination d'eau par le rein et entraîner une augmentation de la contractilité du myocarde. Les souris invalidées pour le précurseur de l'apéline développent une insuffisance cardiaque avec l'âge. La supplémentation avec un analogue de l'apéline, résistant à la dégradation enzymatique, pourrait être bénéfique pour le traitement de l'insuffisance cardiaque. Compte tenu de la faible demi-vie de l'apéline (inférieure à 1 min), nous avons développé un analogue de l'apéline-17 métaboliquement stable ayant une demi-vie *in vivo* de 27 min après administration intraveineuse et de 155 min par voie sous-cutanée chez la souris. De plus, l'apéline étant dégradée par la néprilysine (NEP, EC3.4.24.11) nous envisageons d'utiliser un inhibiteur sélectif de la NEP pour augmenter la durée d'action de l'apéline. Notre projet consistera donc à étudier l'efficacité de cet analogue de l'apéline métaboliquement stable à prévenir le développement de l'insuffisance cardiaque dans un modèle expérimental d'insuffisance cardiaque induite après un infarctus du myocarde (IM) chez la souris. Nous envisageons d'utiliser pour ce projet : 1430 souris Swiss mâles. PROJET 2 L'aminopeptidase A (APA) est une enzyme responsable de la production de l'angiotensine III, le peptide effecteur du système rénine-angiotensine (SRA) cérébral. Après un IM, divers mécanismes contribuent au remodelage et au dysfonctionnement progressif du cœur notamment une augmentation de l'activité du SRA cérébral. Nous avons fait l'hypothèse qu'un traitement par un inhibiteur de l'APA, en bloquant l'activité du SRA cérébral, devrait prévenir l'insuffisance cardiaque. Les premiers résultats montrent qu'après un IM chez la souris, l'administration chronique pendant 28 jours par voie orale d'un inhibiteur de l'APA, normalise l'activité APA au niveau des animaux contrôles et améliore la fonction cardiaque. Les inhibiteurs de l'APA sont actuellement testés chez l'homme dans un essai clinique de phase IIb dans l'hypertension résistante et un essai clinique de phase IIa dans le traitement post-IM. En attendant ces résultats, de nouveaux inhibiteurs de l'APA, 10 fois plus

puissants et surtout très sélectifs de cette enzyme, ont été développés et permettraient de réduire les doses administrées et limiter le risque d'effets secondaires.

L'association de ces nouveaux inhibiteurs de l'APA avec un inhibiteur de la NEP, un diurétique, et un inhibiteur de l'enzyme de conversion seront également évalués. Nous envisageons d'utiliser pour le projet 2 : 1092 souris Swiss mâles. Dans l'objectif d'une application clinique dans le traitement de l'insuffisance cardiaque, ce projet vise à démontrer l'intérêt thérapeutique d'un inhibiteur de l'APA, administré par voie orale, dans la prévention/traitement de l'insuffisance cardiaque. Différents inhibiteurs de l'aminopeptidase A seront testés. Conformément à la règle des 3R, différents moyens ont été mis en œuvre pour réduire dans les deux projets le nombre d'animaux et pour raffiner les protocoles afin de réduire la souffrance et le stress des animaux. Pour cela, nous avons calculé le nombre d'animaux nécessaires à ces projets via l'utilisation d'une analyse statistique $1430 \text{ (projet 1)} + 1092 \text{ (projet 2)} = 2522$ souris SWISS (ou CD1) seront utilisés pour l'ensemble des études (« Réduction »).

Les doses d'analogues de l'apéline et des inhibiteurs de l'APA ont été déterminées selon des études précédemment réalisées et publiées dans des journaux à comité de lecture afin d'affiner le nombre d'animaux nécessaires pour la réalisation de ce projet. La procédure chirurgicale sera réalisée par des personnes habilitées à le faire tout en respectant le bien-être animal. Pour éviter toute souffrance, elle sera réalisée sous anesthésie générale avec administration d'un analgésique local au niveau du site chirurgical et d'un anti-inflammatoire non stéroïdien. Si une souffrance est détectée, l'administration d'un morphinique (buprénorphine) sera réalisée. Un suivi journalier des animaux sera effectué tout au long du projet, avec une attention accrue pendant les 72h suivant la procédure. Les animaux seront placés dans un environnement calme, propre et enrichi. Des analyses échocardiographiques seront réalisées sous anesthésie gazeuse (isoflurane), avant la procédure puis 14 et 28 jours pour réduire le stress de l'animal (« Raffinement »). Avant de tester un composé pharmacologique chez l'Homme, différents tests précliniques doivent être obligatoirement réalisés dans un modèle mammifère afin d'analyser l'efficacité du composé dans un organisme entier et vérifier l'absence de toxicité, d'effets secondaires, de réactions immunitaires, et d'adapter correctement les doses. Il n'est pas possible, à ce jour, d'effectuer ces tests dans un modèle alternatif (« Remplacement »).

14957 La dermatite atopique, aussi appelée eczéma atopique, est une maladie chronique inflammatoire de la peau. Elle se développe préférentiellement chez le nourrisson et l'enfant, mais peut persister voire apparaître parfois chez l'adolescent et l'adulte. Elle est caractérisée par une sècheresse cutanée associée à des lésions de type eczéma (rougeurs et démangeaisons, vésicules, suintement et croûtes) qui évoluent par poussées. Environ 1 enfant sur 10 est touché par cette maladie. Cette pathologie est souvent associée à des allergies alimentaires, des rhinites allergiques, des crises d'asthme.

Les complications les plus fréquentes des dermatites atopiques sont les colonisations des lésions cutanées par le staphylocoque doré ou le virus de l'herpès. Certaines dermatites peuvent être associées à des retards de croissance et des complications ophtalmologiques (kérato-conjonctivites fréquentes, cataracte, détachement rétinien). Comme de nombreuses maladies chroniques, la dermatite atopique peut avoir un retentissement psychologique important, source de troubles du sommeil, d'irritabilité voire de syndrome dépressif. En effet, il existe des médicaments efficaces validés en clinique qui soulagent les symptômes de la maladie. Mais les patients ne guérissent pas. De plus, certains patients peuvent avoir des contre-indications pour les médicaments de références existants. C'est pour cela que la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques est indispensables. C'est pourquoi l'étude de nouvelles molécules thérapeutiques est nécessaire.

La phase préclinique qui consiste à l'étude de l'action des agents pharmacologiques *in vivo* chez le rongeur est une étape essentielle dans le développement de médicaments. Ce projet a pour but de tester de nouveaux médicaments à viser anti-inflammatoire permettant de diminuer ou d'inhiber le développement de la maladie. La dermatite atopique est induite par application cutanée d'une solution de MC903 (C4369, Calcipotriol hydrate, Sigma, 2nmol/souris, dilué dans 100% éthanol) au niveau des oreilles une fois par jour sur 12 jours. Cette solution permet l'assèchement progressif

de la peau, conduisant à un érythème puis à la desquamation de cette dernière. Les symptômes tels que la rougeur, l'épaississement, la sécheresse, commencent à apparaître progressivement à partir de 4 jours de traitement avec la solution MC903. Cette administration va entraîner chez l'animal une lésion cutanée pouvant induire des douleurs. Les animaux seront ensuite mis à mort au bout de 12 jours pour analyser différents paramètres immunologiques. Ceci permettra d'étudier l'efficacité des molécules testées sur le développement de la maladie (signes cliniques) et de l'inflammation. Les molécules testées peuvent être administrées par voie orale, intra-nasale, intra-trachéale, intra-veineuse, intra-péritonéale, sous-cutanée et pour application directe sur la peau en préventif, soit 1h à 15 jours avant induction de maladie, ou en curatif, soit au moment de la maladie, 1 à 2 fois par jour, en fonction de la voie d'administration. Aucun signe clinique n'est attendu suite à l'administration des molécules à tester, en revanche si suite au suivi quotidien des animaux, un signe de souffrance est détecté dû à une molécule à tester, des mesures préventives tels que l'arrêt du traitement seront effectuées.

L'animal utilisé est la souris C57BL/6 ou BALB/c. L'application de la solution à l'animal se fait par voie cutanée. Ce modèle induit des prurits à l'animal, liées au développement de la maladie cutanée. La mobilité, le comportement et un bon aspect des animaux sont observés quotidiennement y compris les week-ends pendant la période d'acclimatation et d'expérimentation. Les animaux sont hébergés par 5 maximum dans des cages de 530 cm² à fond plein sur portoir ventilé. Le projet représente un ensemble d'études types. Le nombre d'études réalisées durant la période de validité de l'autorisation dépendra du nombre de molécules à tester. Le projet pourra comporter jusqu'à 20 études incluant au maximum 90 animaux soit 1800 animaux au total

A ce jour, l'animal de laboratoire reste le seul recours fiable et pertinent permettant de tester des nouvelles molécules thérapeutiques ciblant la dermatite atopique.

Ce projet sera réalisé en respectant les principes fondamentaux de l'expérimentation animale

Remplacement : le modèle animal est fondamental dans notre cas, puisque l'étude de l'inflammation et de la pathologie ne peut se faire que sur un organisme vivant entier.

Raffinement : les animaux sont observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être et d'éviter au maximum la douleur au moment de l'expérimentation. Une grille de score permettant le suivi de l'animal (aspect, comportement et perte de poids) est mise en place, dont découlent des points limites (surveillance renforcée, mise à mort) afin de limiter la souffrance de l'animal.

Réduction : le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement pertinents et reproductibles, évitant ainsi de refaire plusieurs fois les mêmes expérimentations.

14958 Les fonctions vitales telles que la respiration et la marche (ou locomotion) sont gérées par le système nerveux dans des structures bien déterminées. Le siège de la respiration se situe dans le tronc cérébral. Le siège locomoteur implique à la fois le tronc cérébral et la moelle épinière. Cependant les communications neuronales impliquées dans la coordination de ces deux fonctions, dont le meilleur exemple est l'adaptation respiratoire lors d'un exercice physique comme la course, ne sont pas encore bien établies. Y remédier est un enjeu majeur en Neurosciences et en santé publique puisque l'interruption de cette communication pourrait contribuer à une perte d'autonomie motrice suite à une lésion de la moelle épinière ou à des maladies neurodégénératives. Ce projet vise à identifier d'un point de vue moléculaire et physiologique les connexions entre les groupes de neurones qui contrôlent la marche et ceux qui contrôlent la respiration et qui seraient responsables de notre capacité à augmenter la respiration pendant, et même avant, l'exercice. Pour y répondre, le recours à l'expérimentation animale est indispensable puisqu'il s'agit de caractériser des connexions entre des régions très distantes du système nerveux et dont la complexité est uniquement accessible sur l'animal. D'autre part il s'agit de caractériser le rôle qu'exercent ces neurones et connexions sur l'exécution d'une tâche motrice, non-exprimée par des modèles cellulaires. La souris s'impose par les facilités d'élevage et la disponibilité de lignées génétiquement modifiées permettant des manipulations ciblées d'un neurone génétiquement défini. En pratique, nous déploierons en parallèle investigations anatomiques (cartographie, ou « traçage », des

neurones et de leurs connexions) et fonctionnelles (comportement de l'animal en réponse à l'activation de ces mêmes neurones et connexions). La partie neuro-anatomique repose sur des injections, au sein du tronc cérébral ou de la moelle épinière, de « traceurs neuronaux », molécules capables de marquer des petits groupes de neurones et révéler leurs projections. Ces injections se feront sur souris adultes, pendant une chirurgie sous anesthésie. La cartographie des projections sera réalisée sur les prélèvements, quelques semaines après la chirurgie, permettant de générer des atlas de données anatomiques pour chaque lignée de souris utilisée. L'approche fonctionnelle aura pour objet de caractériser la nature des changements respiratoires dépendants des projections mises en évidence par l'étude neuro-anatomique. Nous déploierons donc une étude chez l'adulte dont la plus grande partie fera appel à l'optogénétique, c'est-à-dire à des modifications de l'activité de certains neurones par la lumière. Ainsi après une injection d'un marqueur moléculaire, les animaux anesthésiés recevront un implant permettant par la suite d'apporter la lumière dans le cerveau. Après une période de récupération post-opératoire, les souris seront soumises à des tests comportementaux non douloureux dans le but d'étudier les changements des activités respiratoire et locomotrice résultant de la stimulation des neurones étudiés par la lumière. Une partie des souris sera implantée avec des micro-électrodes, placées au niveau du diaphragme et de la patte pour mesurer en parallèle l'activité de ces deux muscles. Une partie des souris sera soumise à des tests de locomotion sur tapis roulant. Les micro-électrodes implantées sont non douloureuses et ne perturbent pas le comportement locomoteur. Pour chaque chirurgie, les animaux recevront une médication appropriée permettant une meilleure récupération post-opératoire une anesthésie gazeuse rapidement réversible, des analgésiques pour réduire la douleur et l'inflammation des tissus opérés, une hydratation appropriée. La température corporelle sera contrôlée et maintenue par l'usage d'un tapis chauffant thermostaté. Les animaux opérés ne seront pas isolés après la chirurgie. Ils seront remis avec leurs congénères dans une cage propre contenant un enrichissement adéquat (carrés de coton, maison en carton, accordéons en carton, tunnels en carton) avec accès illimité à l'eau et la nourriture. Les animaux feront l'objet d'un suivi post-opératoire intense pendant 4 ou 7 jours (en fonction de la procédure) de la manière suivante observation de l'animal, réaction à la manipulation, vérification des sutures, pesée. Les différents critères observés permettront d'établir une fiche de suivi des animaux, scorée de 0 à 2 (signe absent « 0 », signe modérément présent « 1 », signe présent « 2 »). Pour réaliser ces deux études (neuro-anatomique et fonctionnelle), chaque lignée de souris utilisée sera associée à des traceurs neuronaux ou vecteurs moléculaires ayant des propriétés particulières. Ces lignées transgéniques présentent toutes un phénotype non dommageable. Elles ont été choisies après une étude bibliographique approfondie pour restreindre l'action du traceur/vecteur à un type de neurone candidat pertinent pour notre étude et ainsi réduire le nombre d'animaux utilisés. Nous étudierons 6 types de neurones source candidats. Pour chaque type neuronal, nous utiliserons un maximum de 5 vecteurs moléculaires différents. Pour chaque combinaison étudiée (un type neuronal modifié par un vecteur moléculaire), nous devons reproduire l'observation (8 fois pour le volet anatomique, 10 fois pour le volet fonctionnel), pour s'assurer de sa reproductibilité entre individus. A cela s'ajoute 5 animaux par type de neurone candidat pour la mise au point des procédures. Ces animaux seront générés dans notre animalerie. Une cinquantaine d'animaux non génétiquement modifiés supplémentaires sera dédiée à l'étude fonctionnelle visant à identifier les neurones respiratoires nécessaires à l'adaptabilité pendant l'exercice. Au total, 635 animaux seront utilisés.

14959 Les maladies cardiovasculaires (MCV) représentent la première cause de décès dans le monde 30% des décès annuels (plus de 23 millions de décès en 2011, dont 4 millions en Europe). L'hypercholestérolémie est un facteur de risque associé au développement des MCV, telle que l'athérosclérose. Les approches thérapeutiques actuelles pour réduire les taux de cholestérol plasmatiques chez l'Homme reposent sur des approches visant à diminuer la synthèse et/ou l'absorption de cholestérol. Bien que ces approches paraissent attractives, elles présentent plusieurs limites (patients non-répondeurs et effets secondaires). De nouvelles stratégies thérapeutiques plus efficaces doivent être développées pour restaurer un taux de cholestérol normal dans l'organisme. Récemment, il a été démontré que le microbiote intestinal régule la

cholestérolémie de l'hôte et pourrait constituer une nouvelle cible thérapeutique de choix pour le traitement de l'hypercholestérolémie et de ses troubles associés.

Trois mécanismes bactériens peuvent être associés à la modification de la cholestérolémie par le microbiote intestinal. Dans ce contexte, des travaux antérieurs ont permis de sélectionner la voie bactérienne qui challenge le mieux la cholestérolémie chez des souris saines soumises à un régime riche en cholestérol. La dégradation du cholestérol par cette voie bactérienne pourrait contribuer à l'élimination du cholestérol de l'organisme, et ainsi limiter la cholestérolémie et le développement de l'athérosclérose.

L'objectif de cette procédure est i) d'évaluer cette voie bactérienne du microbiote pour challenger, de manière préventive, la cholestérolémie dans un modèle préclinique plus proche de l'homme, le lapin Néozélandais soumis à un régime enrichi en cholestérol, et ii) d'évaluer l'effet curatif de cette activité bactérienne au niveau des lésions athérogéniques retrouvées dans l'athérosclérose, chez le lapin WHHL (Watanabe Heritable HyperLipidemic). Cette approche globale permet de mieux appréhender le potentiel de la bactérie candidate dans un contexte pathologique avec le modèle lapin. La lignée de lapins WHHL présente spontanément une hypercholestérolémie accompagnée de lésions athérogéniques prononcées (plaque d'athérome, thrombose), symptômes similaires à ceux observés chez l'homme atteint d'athérosclérose.

Afin d'analyser la capacité de l'activité bactérienne du microbiote qui réduit la cholestérolémie dans un contexte préventif, nous utiliserons 5 groupes de 10 lapins néozélandais qui recevront les traitements suivants Groupe 1 aliment standard, Groupe 2 aliment enrichi en cholestérol, Groupe 3 aliment enrichi en cholestérol et bactérie porteuse d'activité bactérienne d'intérêt (10^{10} UFC/jour), Groupe 4 aliment enrichi en cholestérol et statine (Rosuvastatine, 20 mg/kg/jour), Groupe 5 aliment enrichi en cholestérol et association des deux traitements précédents.

Afin d'analyser la capacité de l'activité bactérienne du microbiote qui réduit la cholestérolémie dans un contexte curatif, nous utiliserons 4 groupes de 12 lapins WHHL qui recevront les traitements suivants Groupe 1 aliment standard, Groupe 2 aliment standard et bactérie porteuse d'activité bactérienne d'intérêt (10^{10} UFC/jour), Groupe 3 aliment standard et statine (Rosuvastatine, 20 mg/kg/jour), Groupe 4 aliment standard et association des deux traitements précédents.

Le nombre total de lapins utilisés pour l'ensemble du projet est de 98 lapins.

Les solutions (bactéries ou statine) seront administrées quotidiennement par gavage oral pendant 10 semaines, geste maîtrisé au sein de notre équipe. Durant l'expérience, l'évaluation de paramètres cardiovasculaires (rigidité et imagerie des artères), le prélèvement sanguin (cholestérolémie) et de fèces (dégradation du cholestérol et de ces dérivés par les bactéries, analyse microbiote) seront effectués tout au long de l'expérimentation. Un suivi du bien-être des animaux sera assuré quotidiennement et ce en particulier après le geste de gavage par le personnel compétent et du fait de la fragilité de ces modèles expérimentaux (personnel animalier de la plateforme, expérimentateur de l'équipe). L'euthanasie des animaux s'effectuera suivant la réglementation en vigueur et les organes d'intérêts seront collectés (aorte, carotide, intestin, foie, tissu adipeux, ...) pour caractériser le potentiel thérapeutique *in vivo* de la voie bactérienne d'intérêt dans le développement d'athérosclérose par des approches au niveau fonctionnel, et mécanistique (expression de gènes, histologie, hémodynamique, analyse microbiote).

Remplacer L'analyse de l'impact du microbiote intestinal sur la cholestérolémie nécessitant l'utilisation d'un organisme complexe, le recours à l'animal est indispensable. En effet, utiliser uniquement une approche *in vitro* exclurait la prise en compte des possibles interactions intervenant chez l'hôte. L'utilisation de modèles pathologiques, comme le lapin soumis à un régime enrichi en cholestérol ou le lapin WHHL, permet d'évaluer le potentiel de la voie bactérienne en profondeur sur un modèle présentant le développement des symptômes (hypercholestérolémie avec des lésions au niveau des artères) similaires à ceux observés chez l'homme dans l'athérosclérose.

Réduire Le nombre total de lapins pour ce projet est de 98, car il faut prendre en compte la mortalité spontanée de l'ordre de 20 % dans ces modèles (Objectif final d'avoir 8 à 10 lapins par groupe expérimental). Le nombre de lapins nécessaires a été défini à l'aide d'études précédentes publiées

dans la littérature scientifique et grâce à un test de puissance afin de solliciter un nombre minimum d'animaux, tout en gardant la possibilité d'obtenir des résultats statistiquement exploitables.

Raffiner Les lapins seront répartis au nombre de 2 par cage dans lesquelles eau et nourriture seront disponibles et les paramètres ambiants seront contrôlés régulièrement (température, hygrométrie). Un enrichissement sera assuré par ajout de ballon en plastique, paille compactée pour préserver l'environnement naturel de l'animal. L'état de santé des animaux sera surveillé durant l'expérimentation permettant l'intervention rapide en cas de problème (grille d'évaluation clinique).

14960 La radiothérapie est l'une des méthodes les plus efficaces et les plus utilisées pour traiter les cancers. Au moins 50% des patients atteints d'un cancer seront traités par radiothérapie durant leur maladie.

Le principal défi de la radiothérapie est de parvenir à déposer une dose curative dans la tumeur tout en s'assurant que les tissus sains environnants soient préservés dans leur intégrité. Pour certains types de tumeurs radiorésistantes comme les gliomes (tumeurs cérébrales), la radiothérapie ne peut être que palliative. Pour parvenir à une dose de radiation curative, le risque de dommages graves aux tissus sains est trop élevé pour pouvoir être considéré.

Dans ce contexte, notre objectif principal s'inscrit dans l'amélioration des traitements de radiothérapie. Pour ce faire, nous explorons de nouvelles approches et nous proposons de développer des techniques innovantes utilisant de nouvelles modalités de traitement. Dans le cadre de ce projet, nous nous focaliserons sur des techniques innovantes qui ont montré dans des études préliminaires un intérêt significatif dans la préservation des tissus sains (même à des doses très élevées) ainsi qu'un effet très intéressant sur le contrôle de la croissance tumorale chez le rat. Ces études seront complétées pour valider l'efficacité de ces nouvelles techniques de radiothérapie en comparaison à celle utilisée actuellement chez le patient. Nos critères d'évaluation pour l'efficacité de la technique vont porter sur la préservation des tissus sains environnants la tumeur et sur le contrôle de la croissance des tumeurs irradiées. Aussi, le recours à des méthodes alternatives n'est pas envisageable dans ce projet et il nous est indispensable de développer des modèles animaux.

Pour la réalisation de ce projet, 1182 rats seront inclus dans des groupes de traitement comportant différentes doses et différentes configurations d'irradiation. Le nombre d'animaux a été statistiquement défini pour permettre l'obtention de résultats fiables avec le moins d'animaux possible. Notre projet va nécessiter de travailler sur des rats chez lesquels la taille plus importante du cerveau va être plus adaptée aux types d'irradiations proposées dans le cadre des procédures expérimentales. En accord avec les recommandations internationales dans le domaine de la cancérologie, un suivi clinique régulier sera réalisé pour s'assurer du bien-être des animaux (suivi du poids rigoureux et quotidien, mise en place de points-limites).

14961 L'arthrose, est caractérisée par une érosion du cartilage, la formation d'ostéophytes, une sclérose osseuse sous-chondrale et une inflammation synoviale. L'arthrose est également couramment décrite comme la conséquence d'une perturbation de l'homéostasie des tissus cartilagineux. Étant donné que le vieillissement est l'un des principaux facteurs de risque de l'arthrose, nous proposons de tester des facteurs anti-âge pour le traitement de cette maladie. Parmi les facteurs anti-géroniques, la protéine alpha-klotho (a-KL) semble être l'un des plus pertinents, car plusieurs polymorphismes du gène a-KL sont associés à un risque accru d'arthrose et des niveaux différents d'ARNm d'a-KL ont été rapportés entre le cartilage articulaire sain et arthrosique.

Cependant, le rôle de Klotho dans la physiopathologie du cartilage articulaire reste inconnu. Dans ce contexte, l'objectif de ce projet est d'explorer le rôle de la protéine anti-géronique a-KL dans l'arthrose. Pour cela, nous avons généré une souche de souris dépourvues d'a-KL spécifiquement dans le cartilage articulaire. Ces souris vont nous permettre d'analyser l'impact de la délétion de la protéine a-KL sur la survenue d'une arthrose post traumatique chirurgicalement induite.

La procédure n°1 a pour but de déterminer si la dose de tamoxifène injectée permet d'obtenir une délétion optimale d'a-KL dans le cartilage. Nous évaluerons également si la délétion d'a-KL dans le cartilage présente des effets secondaires néfastes sur la santé générale de la souris. Les souris

recevront des injections IP de 1mg de tamoxifène /10g de souris pendant 5 jours consécutifs. A 1, 2 et 8 semaines post-injection, les souris subiront une ponction intracardiaque terminale décrit dans la procédure n°3. Puis seront sacrifiées par dislocation cervicale. Des prélèvements de cartilage seront effectués afin de vérifier la délétion d'a-KL au niveau transcriptomique et protéique. A l'issue de la procédure n°1, si des effets délétères importants (nécessitant le sacrifice anticipé) sont observés chez les souris, la procédure n°2 ne sera pas mise en œuvre.

La procédure n°2 a pour objectif d'évaluer l'impact d'une délétion d'a-KL dans le cartilage articulaire sur l'apparition et l'évolution de l'arthrose post traumatique. Les souris recevront à l'âge de 9 semaines des injections de Tamoxifène selon le protocole décrit dans la procédure n°1 (excepté le groupe contrôle du tamoxifène). Ensuite ces souris subiront soit une induction chirurgicale d'arthrose par déstabilisation de ménisque médial (DMM) unilatérale. A 2, 6 et 12 semaines post induction chirurgicale d'arthrose, les souris subiront une ponction intracardiaque terminale décrit dans la procédure n°3, puis seront sacrifiées par dislocation cervicale. Les pattes, le rachis, la tête et le rein seront prélevés pour évaluer le niveau d'arthrose par des analyses moléculaires, radiologiques, histologiques et immunohistochimiques et pour l'analyse des niveaux d'a-KL.

Ce projet prend en compte la règle des 3R en appliquant les consignes suivantes

Je réduis le nombre d'animaux en utilisant le nombre minimal requis pour chaque type de test afin d'atteindre une significativité statistique.

La procédure 1 utilisera un total de 30 souris de 9 semaines réparties en 3 groupes (temps de sacrifice post injection : 1, 2 et 8 semaines) de 5 souris/génotype (2 génotypes étudiés).

La procédure 2 utilisera un total de 780 souris réparties en groupes de 10 souris par temps (3 temps : 2, 6 et 12 semaines post-DMM) par type d'analyse (2 types : moléculaire ou radiologique/histologique) soit 120 souris femelles et 120 souris mâles seront utilisées pour étudier l'effet de 3 génotypes différents (Wild type, homozygote et hétérozygote) ou en groupes de 5 souris par temps et par type d'analyse soit 30 souris (mâles ou femelles) pour les 2 groupes contrôles (permettant de vérifier l'effet du tamoxifène seul et l'effet de l'expression de la recombinaison Cre).

La procédure 3 ne concerne que les animaux de la procédure 1 et 2, elle n'utilisera pas d'animaux supplémentaires. Cette saisine nécessitera donc un total de 810 souris.

Je raffine en réduisant la douleur lors des expérimentations afin d'améliorer la reproductibilité et la qualité de l'expérimentation. Ainsi, une analgésie péri-opératoire immédiate est prévue par administration de buprénorphine et méloxicam en pré et post-chirurgie. Les souris seront hébergées à raison de 5 souris par cage. Elles seront observées et pesées quotidiennement les trois premiers jours après la chirurgie puis 2 fois par semaine jusqu'à la fin de l'expérimentation. Par ailleurs, des points limites ont été identifiés et les procédures de raffinement à mettre en place lors de l'atteinte de ces points limites ont été décrites.

Malheureusement, je ne peux pas remplacer cette expérimentation animale par un modèle *in vitro*, car cette étude vise à déterminer l'impact de l'inactivation d'un gène sur l'apparition de l'arthrose.

14962 En médecine, la transplantation constitue un des progrès les plus marquants des cinquante dernières années. Aujourd'hui, le grand public a parfaitement conscience

- Que le seul moyen de sauver la vie d'un être humain, lorsque toutes les ressources thérapeutiques sont épuisées, c'est la transplantation pour les organes vitaux comme le cœur, le foie.

- Que pour les autres organes comme le rein, la transplantation transforme l'existence des patients, en leur offrant une qualité de vie inespérée, en permettant un retour à une vie relationnelle et professionnelle normale.

Actuellement, le nombre d'années de vie après une transplantation est de plusieurs années. Il existe bien entendu des variations individuelles, mais certains transplantés peuvent jouir de plusieurs décennies de vie avec un greffon fonctionnel.

Malgré ces résultats extraordinaires, il est nécessaire d'améliorer les traitements anti-rejet dans le but d'augmenter la durée de vie des greffons et de limiter les complications dues aux effets secondaires des médicaments anti-rejet (risque infectieux et cancéreux).

Le but de ce projet de recherche est de modifier génétiquement un sous type de cellules immunitaires appelé lymphocytes T régulateurs, pourvus de propriétés protectrices pour qu'ils atténuent la réaction de rejet. Ces lymphocytes génétiquement modifiés appelés CAR Tregs permettraient de limiter l'utilisation de médicaments antirejet ayant des effets néfastes au long terme chez les patients transplantés. Nous avons établi l'efficacité des CAR Tregs *in vitro* et souhaitons désormais démontrer leur potentiel thérapeutique *in vivo*. En effet, la complexité des réponses immunes en transplantation ne peut être récapitulée que dans un modèle *in vivo*.

Le premier modèle *in vivo* consiste à injecter des leucocytes humains contenant des lymphocytes T responsables de la réaction de rejet, dans des souris dénuées de défense immunitaire (immunodéprimées). Plus précisément, les incompatibilités immunologiques entre humain et souris sont à l'origine d'une réaction forte des leucocytes humains contre la souris, induisant des lésions au niveau de certains tissus comme le poumon. Ce phénomène de rejet est appelé « maladie du greffon contre l'hôte ». Nous souhaitons montrer que les cellules que nous avons génétiquement modifiées, les CAR Tregs, sont capables de limiter ce type de rejet. Le second modèle a recours à la greffe de peau chez la souris. En effet, le transfert de cellules humaines chez la souris immunodéprimée lui confère la capacité de rejeter une greffe de peau. Nous voulons montrer que la greffe de peau sera protégée du rejet par les CAR Tregs. La greffe de peau suscite une réponse immune très forte. La prévention du rejet dans ce modèle serait un argument préclinique très robuste et convaincant pour porter cette nouvelle stratégie vers une utilisation chez l'homme.

Dans cette saisine, le principe des 3R a été suivi comme suit

Remplacer Des études fonctionnelles *in vitro* ont été réalisées avec des cellules humaines afin d'optimiser les conditions de préparation du produit de thérapie cellulaire et de transfert de gène. Toutes les étapes visant à améliorer la performance du vecteur de thérapie génique ont été mises au point avec des expériences exclusivement *in vitro*. Ces expériences chez l'animal interviennent donc au terme d'un long processus et s'inscrivent dans le cadre d'une validation *in vivo* de l'effet thérapeutique de ces cellules avant un développement clinique.

Réduire Le nombre total de souris impliquées dans les expériences sera de 182 souris.

Afin de réduire le nombre d'animaux, les scores d'évaluation clinique les plus objectifs, prédictifs et robustes seront privilégiés.

Raffinement Afin de limiter la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, une surveillance rapprochée et l'utilisation d'antalgiques sont prévues. Des points limites ont été établis afin d'anticiper le sacrifice de l'animal si nécessaire. De plus, le milieu d'hébergement sera enrichi à l'aide de coton de nidification. Une anesthésie générale à l'isoflurane et l'utilisation d'antalgique local seront appliquées lors des prélèvements retro-orbitaires.

A terme, les résultats de ce projet permettront l'acquisition de données indispensables au développement clinique d'une thérapeutique innovante, à fort potentiel translationnel

14963 Le test de suspension caudale a été développé en tant qu'alternative au test de nage forcée, et repose sur un concept similaire.

Le Test de Suspension Caudale permet l'évaluation rapide des effets psychotropes de drogues et substances (antidépresseurs), ce qui en fait un test classique pour la recherche sur la dépression.

Le test est réalisé sur des souris. Une étude standard comprend 60 animaux répartis en 5 groupes de 12 sujets, qui reçoivent le produit testé à 3 doses, un produit de référence et un placebo. Des études peuvent comprendre un nombre plus élevés ou plus faible d'animaux (par exemple pour l'étude d'un nombre de doses supérieur ou inférieur).

Le nombre maximum de produits testés par an est de 10.

Le nombre total maximum d'animaux utilisées sur 5 ans est de $3\ 000 = 60 \text{ animaux/étude} \times 10 \text{ études/an} \times 5 \text{ ans}$.

Respect de la règle des 3R

- Réduire. Le nombre total d'animaux utilisés pour une étude est fonction du nombre de groupes et du nombre d'animaux par groupe nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement interprétables.

- Justification du nombre de groupes. Le groupe témoin est nécessaire à chaque expérience compte tenu des variations de performances entre lots d'animaux. Le groupe produit de référence est nécessaire pour valider l'expérience et pour comparer l'efficacité du produit testé à un produit de référence. Il est généralement nécessaire de tester le produit à trois doses pour mesurer la relation dose-effet, mais un nombre de doses inférieur ou supérieur peut être justifié en fonction de l'état de connaissance du produit.

- Justification du nombre d'animaux par groupe. Compte tenu de la variabilité interindividuelle des variables mesurées dans ce test, ce nombre a été fixé à 12 animaux par groupe. L'utilisation d'un nombre inférieur d'animaux a une probabilité importante d'entraîner la non-validité de l'étude, conduisant à la refaire, et par conséquent à utiliser un nombre d'animaux plus élevé.

- Raffiner. Des animaux présentant des signes de souffrance sont euthanasiés. Outre la motivation éthique conduisant à cette euthanasie, celle-ci est requise pour des raisons expérimentales, la souffrance d'un animal biaisant les variables comportementales mesurées. L'utilisation de traitements pour pallier à cette souffrance est exclue, ces types de traitement étant susceptibles de modifier le comportement des animaux et l'action pharmacologique des produits étudiés.

- Remplacer. Il n'existe pas à ce jour de modèle n'utilisant pas d'animaux ou nécessitant un nombre plus réduit d'animaux ou ayant un degré de sévérité inférieur permettant d'obtenir des informations équivalentes à celles obtenues par le présent modèle.

14964 Le lupus érythémateux disséminé (LED) est une maladie autoimmune caractérisée par la production d'autoanticorps (autoAc) dirigés contre une multitude de composés de l'organisme. La production de ces autoAc est associée à une inflammation pouvant toucher différents organes. Les souris MRL/lpr développent une maladie très proche du LED humain et pratiquement tous les autoAc produits par les patients lupiques sont également retrouvés dans le sang périphérique de ces souris. Dans ce cadre, il a été découvert chez les patients et les souris MRL/lpr la présence encore ignorée jusqu'alors d'Ac dirigés contre une protéine qui joue un rôle vital dans le fonctionnement du lysosome (vésicule présente dans le cytoplasme des cellules et qui y joue un rôle majeur dans le maintien de l'équilibre vie/mort de la cellule). Cette protéine transmembranaire du lysosome est responsable de la reconnaissance des substrats à dégrader par l'une des voies de l'autophagie garante de l'équilibre du milieu intérieur de la cellule (résultats brevetables non publiés). Ces autoAc et la cible reconnue ont été étudiés sur le plan physicochimique et cellulaire. Les études ont également permis de découvrir d'autres autoAc dont les spécificités ne peuvent être indiquées ici.

Se pose à présent la question de savoir si ces autoAc sont pathogènes, ce qui expliquerait au moins en partie certains défauts métaboliques chez les individus lupiques qui produisent ces autoAc. L'objectif est d'injecter les Ac mentionnés, purifiés de souris MRL/lpr à des souris MRL/lpr jeunes (souris de 5 semaines au début de l'expérience) pour voir l'effet sur l'apparition de la pathologie, notamment rénale, chez ces souris. Les souris MRL/lpr contrôle (même âge) recevront une solution saline (2 souris) ou des immunoglobulines normales (2 autres souris). Cette étude sera refaite 2 fois (soit 2 souris/groupeX3 expériences=6 souris/groupeX4 groupes (avec les témoins) =24 sourisX5 ans=120 souris. Pour l'élevage, il faudra 120 femelles et 125 mâles/an=250 sourisX5 ans=1250 souris. Total 5ans=1370 souris. Le nombre de souris utilisé a été calculé pour pouvoir obtenir des résultats fiables. Les souris seront hébergées par groupes dans des cages de taille réglementaire sans dépasser le nombre maximal autorisé de souris par cage et seront rassemblées en groupes sociaux. Du matériel d'enrichissement sera ajouté dans les cages. Les nids permettent aux souris d'avoir de conditions socialisantes, le coton est indiqué pour la nidification. Des bâtons de bois à ronger seront placés dans les cages pour limiter les comportements d'agressivité. Les souris seront maintenues à une température de 22°C dans une atmosphère dont le taux d'humidité est de 80% et un cycle éclaircissement/obscurité de 12h/12h, conformément aux conditions optimales demandées par la législation. Elles auront accès à la nourriture et à l'eau de boisson ad libitum. Elles seront anesthésiées avant chaque prélèvement sanguin ou injection. Pour surveiller la douleur

et la limiter, les souris seront observées quotidiennement en respectant les points limites affichés dans notre animalerie (respect de la règle des 3R en terme de raffinement). Il n'est pas possible d'assurer la règle du remplacement, ces études nécessitant le système immunitaire complet, inné et adaptatif pour suivre les effets physiopathologiques de l'injection des anticorps.

14965 L'objectif de ce projet est scientifique et médical. Il s'agit d'évaluer le rôle des mécanismes de neuromodulation des neuropathies dans l'espoir d'identifier de nouvelles pistes thérapeutiques. Les neuropathies sont des maladies des nerfs périphériques qui peuvent avoir des causes diverses (traumatiques, métaboliques, toxiques, infectieuses...) et peuvent provoquer des perturbations fonctionnelles, sensorielles et émotionnelles sérieuses qui sont extrêmement difficiles à traiter. Les expériences décrites dans cette saisine proposent de mesurer l'impact de molécules agissant sur ces récepteurs à la fois sur les symptômes sensoriels et anxiodépressifs dans un modèle murin de neuropathie périphérique. Le recours à l'expérimentation animale est nécessaire pour cette étude car il n'existe pas à ce jour de modèle alternatif à l'animal pour étudier des réactions comportementales intégrées qui ne peuvent pas être modélisées en système de culture cellulaire, ou prédites par les neurosciences computationnelles. Néanmoins, notre démarche est conforme à la règle des 3R. Au préalable, afin de mieux cibler les traitements expérimentaux, l'activité de toutes les drogues candidates sur leurs cibles moléculaires sera testée et validée *in vitro* dans des modèles cellulaires. L'outil statistique a été utilisé pour définir au plus juste la quantité d'individus requise pour mener cette étude. Toutes précautions et dispositions seront prises pour éviter toute souffrance inutile des animaux et un tableau des points limites a été établi. De plus, pour réduire le nombre total de souris, les animaux utilisés pour la caractérisation comportementale seront ensuite utilisés pour les analyses biochimiques ou immunohistochimiques post-mortem.

Le besoin total a ainsi été estimé à 560 souris.

14966 Le bisphénol A (BPA), un plastifiant utilisé pour produire des contenants dans l'industrie agroalimentaire, a été reconnu comme un perturbateur endocrinien. A cause de ses effets, le BPA a été interdit en France dans les biberons, les emballages alimentaires et les tickets de caisse. De nouveaux analogues du BPA, dont le Bisphénol S (BPS), ont alors été utilisés comme substituts du BPA. Or, des études *in vitro* ont montré que certains de ces analogues présentaient un potentiel perturbateur endocrinien similaire à celui du BPA.

Par ailleurs, l'exposition au BPA a été décrite comme un facteur de risque de désordres métaboliques comme le diabète et l'obésité. Le métabolisme lipidique est essentiel pour la fonction ovarienne et une augmentation de la proportion des femmes obèses présentant des troubles de la reproduction est rapportée.

Ce projet s'intègre dans un programme plus large qui vise à étudier si le BPS peut affecter la reproduction chez la femme et à étudier les interactions avec le statut métabolique de l'individu. L'hypothèse est que lors d'exposition environnementale à des perturbateurs endocriniens, pour préserver son équilibre, l'organisme met en place des stratégies adaptatives, qui peuvent être dépassées lors de maigreur ou de surpoids.

Ce projet sera mené sur un modèle de brebis gestantes dont le statut métabolique est contrôlé (brebis maigres versus brebis grasses) et nous étudierons les effets d'une exposition chronique au BPS sur le métabolisme et la physiologie ovarienne du fœtus et l'interaction entre le statut métabolique des brebis et l'effet du BPS.

Nous avons choisi le modèle ovin car il est plus pertinent vis-à-vis de l'homme, en terme de métabolisme et de reproduction, que les modèles rongeurs. La complexité des fonctions physiologiques mises en jeu ne permet pas le remplacement du modèle animal intégré par des approches cellulaires qui ne peuvent mimer les processus d'échanges placentaires et les relations étroites materno-foeto-placentaires qui déterminent l'équilibre métabolique.

Quarante-huit brebis et environ 72 fœtus seront utilisés pour ce projet. Elles seront hébergées en groupe dans une bergerie, les brebis maigres et les brebis grasses recevant un régime différencié

pendant toute la durée du projet. Des lots de 10 à 15 brebis seront mis à la reproduction après synchronisation des chaleurs toutes les 2-3 semaines, avec 4 béliers.

Les foetus seront ensuite exposés du 33^{ème} au 135^{ème} jour de gestation (durée de la gestation de 145 jours chez la brebis) via des administrations sous-cutanées maternelles quotidiennes de BPS (0.05 mg/kg/j) ou de solvant. La voie d'administration sous-cutanée a été choisie car la voie orale n'est pas pertinente vis-à-vis de l'Homme pour les ruminants (modification des paramètres pharmacocinétiques par la présence du rumen). Le niveau de dose choisi permet de reproduire des concentrations sanguines de BPS proches de l'exposition humaine. Pour le vérifier, l'exposition des brebis au BPS sera évaluée tout au long de la période de traitement.

Il y aura donc quatre groupes d'au maximum 12 brebis (en fonction de la réussite de la mise à la reproduction qui devrait être de l'ordre de 90-95%) : un groupe de brebis maigres recevant le solvant, un groupe de brebis grasses recevant le solvant, un groupe de brebis maigres recevant le BPS, et un groupe de brebis grasses recevant le BPS. Le nombre de 11 à 12 brebis par groupe correspond au nombre minimum qui permet d'assurer la reproductibilité des mesures et la robustesse des paramètres estimés. Les brebis des groupes témoins reçoivent le solvant afin de reproduire les mêmes conditions expérimentales (administrations quotidiennes) que les groupes traités.

Les foetus au stade 125-130 jours de gestation seront ensuite instrumentés avec deux cathéters mis à demeure dans la veine jugulaire et l'artère carotidienne pour permettre la réalisation d'administrations intraveineuses et de prélèvements sanguins sur le foetus. Ce modèle de foetus ovin instrumenté a été développé précédemment par notre équipe et permet de réaliser des prélèvements répétés pendant plusieurs jours, ce qui n'est pas réalisable chez les rongeurs, ce qui permet de réduire le nombre d'animaux et d'accroître la précision des mesures réalisées.

La procédure chirurgicale sera mise en oeuvre dans des conditions strictes d'asepsie. Après la chirurgie, les brebis seront hébergées dans des box individuels. Afin de limiter l'impact de l'isolement sur le bien-être animal, les box permettront aux animaux d'avoir un contact visuel avec leurs congénères.

Un protocole d'anesthésie générale et de gestion de la douleur adapté sera appliqué lors de la chirurgie et les constantes physiologiques de la mère seront suivies à l'aide d'un appareillage de monitoring cardiorespiratoire. Un examen clinique quotidien des brebis sera réalisé après la chirurgie par un vétérinaire et, en cas de diminution de l'appétit ou de modification du comportement (par exemple diminution de la rumination), un antalgique sera administré.

Le test fonctionnel de réponse insulinique du foetus à l'hyperglycémie sera ensuite réalisé entre 132 et 134 jours de gestation, soit au moins 3 jours après les chirurgies.

A la fin de l'expérimentation, les brebis seront euthanasiées et les foetus seront extraits et euthanasiés. Des prélèvements de liquides biologiques (sang, liquide amniotique) et d'organes (placenta, foie, pancréas, graisse péri-rénale, surrénales, gonades, hypophyse et cerveau foetaux) seront réalisés afin de déterminer des paramètres métaboliques, mais également l'exposition au BPS.

14967 Le Test de Nage Forcée (FST, pour Forced Swimming Test), est un test de comportement populaire pour le développement et le screening d'antidépresseurs et de drogues anxiolytiques afin d'identifier de nouveaux traitements et comprendre les mécanismes biologiques des traitements existants.

Le test est réalisé sur des rats. Une étude standard comprend 60 animaux répartis en 5 groupes de 12 sujets, qui reçoivent le produit testé à 3 doses, un produit de référence et un placebo. Des études peuvent comprendre un nombre plus élevés ou plus faible d'animaux (par exemple pour l'étude d'un nombre de doses supérieur ou inférieur).

Le nombre maximum de produits testés par an est de 10.

Le nombre total maximum d'animaux utilisées sur 5 ans est de 3 000 = 60 animaux/étude × 10 études/an × 5 ans.

Respect de la règle des 3R

- Réduire. Le nombre total d'animaux utilisés pour une étude est fonction du nombre de groupes et du nombre d'animaux par groupe nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement interprétables.

- Justification du nombre de groupes. Le groupe témoin est nécessaire à chaque expérience compte tenu des variations de performances entre lots d'animaux. Le groupe produit de référence est nécessaire pour valider l'expérience et pour comparer l'efficacité du produit testé à un produit de référence. Il est généralement nécessaire de tester le produit à trois doses pour mesurer la relation dose-effet, mais un nombre de doses inférieur ou supérieur peut être justifié en fonction de l'état de connaissance du produit.

- Justification du nombre d'animaux par groupe. Compte tenu de la variabilité interindividuelle des variables mesurées dans ce test, ce nombre a été fixé à 12 animaux par groupe. L'utilisation d'un nombre inférieur d'animaux à une probabilité importante d'entraîner la non-validité de l'étude, conduisant à la refaire, et par conséquent à utiliser un nombre d'animaux plus élevé.

- Raffiner. Des animaux présentant des signes de souffrance sont euthanasiés. Outre la motivation éthique conduisant à cette euthanasie, celle-ci est requise pour des raisons expérimentales, la souffrance d'un animal biaisant les variables comportementales mesurées. L'utilisation de traitements pour pallier à cette souffrance est exclue, ces types de traitement étant susceptibles de modifier le comportement des animaux et l'action pharmacologique des produits étudiés.

- Remplacer. Il n'existe pas à ce jour de modèle n'utilisant pas d'animaux ou nécessitant un nombre plus réduit d'animaux ou ayant un degré de sévérité inférieur permettant d'obtenir des informations équivalentes à celles obtenues par le présent modèle.

14968 Ce projet vise tester des accéléromètres miniaturisés (FishBit) implantés sur l'opercule de daurades de 400 g environ afin de déterminer si les enregistrements de ces appareils permettent de discriminer des daurades à forte efficacité alimentaire de daurades à faible efficacité alimentaire. Améliorer l'efficacité alimentaire est très important pour la durabilité environnementale et économique des élevages de poissons. Pour sélectionner les poissons les plus performants, il faut des mesures individuelles, qui pour l'instant nécessitent des mesures de poissons individuellement isolés en aquarium et nourris d'une quantité connue d'aliment, ce qui est à la fois difficile, cher et peu représentatif d'une vraie situation d'élevage. Utiliser des capteurs embarqués pourrait permettre d'évaluer des poissons dans leur milieu d'élevage. De nouveaux capteurs miniaturisés ont été développés, et il est d'ores et déjà démontré qu'ils peuvent permettre d'évaluer l'activité respiratoire et locomotrice des poissons, dont on sait par ailleurs qu'elles ont liées à l'efficacité alimentaire. Ici, nous utiliserons 20 daurades préalablement caractérisées pour leur efficacité alimentaire en aquarium individuel afin de valider l'hypothèse selon laquelle les capteurs FishBit permettraient de prédire l'efficacité alimentaire individuelle tout en élevant les poissons en groupe dans une procédure peu traumatisante. En effet, il a été démontré que sur des daurades de 300g et plus, l'utilisation du capteur FishBit n'induisait aucun marqueur physiologique de stress. Il faut noter que l'utilisation de ces capteurs étant pour l'instant peu documentée, cette étude est une étude pilote qui permettra de déterminer l'intérêt de la méthode, et de calibrer ensuite des expérimentations permettant de répondre à des questions précises et quantifiées sur les rapports entre activité et efficacité alimentaire chez la daurade. Ce type de mesure ne peut se faire que chez des poissons vivants, donc le Remplacement n'est pas possible. Toutes les manipulations du poisson hors de l'eau et de l'enceinte d'élevage (pêche, implantation des marques FishBit) seront faites sous anesthésie (Raffinement). Le nombre d'animaux (N=20, 10 par groupe) a été choisi pour permettre une évaluation suffisante de la variabilité des réponses observables (Réduction).

14969 Les gamètes (ovocytes et spermatozoïdes) sont issus de la différenciation des cellules germinales au sein des gonades. Cette différenciation, qui débute pendant la vie fœtale et se termine à la puberté, est le fruit de l'activité d'une cascade de nombreux gènes. Chez l'humain, des corrélations ont pu être établies entre des aberrations de la différenciation gonadique et des mutations géniques. De nombreux travaux ont déjà été effectués en utilisant la souris comme animal modèle pour mieux comprendre ces relations entre phénotype et génotype. Cependant, la souris est un animal très

particulier dans le groupe des mammifères en ce qui concerne l'étude de la différenciation sexuelle. En effet, on constate que les études de génomique fonctionnelle chez la souris ne reproduisent pas toujours les phénotypes observés chez de nombreux autres mammifères. Il est donc indispensable d'effectuer des études de génomique fonctionnelle complémentaires chez une autre espèce de mammifère que la souris.

Le projet vise à identifier le rôle d'un gène, le gène DMRT, sur la différenciation gonadique chez le lapin. Chez l'humain, une mutation dans ce gène est associée à une perturbation de la différenciation sexuelle, avec présence d'une gonade de type femelle chez les individus génétiquement males dès la naissance. Chez la souris, l'invalidation de ce gène ne provoque pas ces perturbations à la naissance. L'invalidation de ce gène a donc été entreprise chez une autre espèce, le lapin, car de nombreuses données montrent que cette espèce est un modèle plus proche de l'homme et des autres mammifères que la souris en ce qui concerne l'étude des mécanismes à l'origine de la différenciation des gonades.

Pour invalider le fonctionnement du gène étudié, les lapins seront génétiquement modifiés par la technique de « gene editing ». Cela consiste à injecter dans l'embryon unicellulaire de lapin une nucléase (injection sous forme d'ARN ou de protéine) qui cible une région choisie du génome et provoque l'introduction de mutations (délétions ou insertions) à l'origine de l'invalidation du fonctionnement du gène.

L'expérimentation comprend deux procédures expérimentales

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

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

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

Le protocole prévoit d'utiliser 50 lapines adultes, 54 jeunes lapins (de la naissance à 5 mois), et 60 foetus.

Les travaux sont toujours effectués pour essayer d'atteindre les objectifs en utilisant le plus petit nombre d'animaux possible : pour cela, il est prévu d'effectuer la procédure n°1 plusieurs fois en utilisant à chaque fois un petit effectif d'animaux, et en analysant rapidement les résultats. Dès que le nombre d'animaux fondateurs F0 désiré est atteint, la procédure n°1 n'est plus effectuée et la procédure n°2 est engagée.

Toutes les précautions sont prises pour utiliser les animaux dans des conditions telles que les souffrances éventuellement engendrées sont réduites au maximum, par anesthésie et médication contre la douleur lors des opérations chirurgicales, et par des pratiques d'élevage appropriées. Des points limites sont définis pour les étapes où cela semble nécessaire. L'expérimentation est arrêtée à chaque fois que les points limites sont atteints.

14970 La mise en oeuvre et les résultats des études comportementales chez le rat et la souris sont particulièrement sensibles aux conditions d'environnement dans lesquelles les animaux sont hébergés et les tests réalisés, nécessitant de devoir étudier et valider ces pratiques dans le cadre dans lequel elles sont réalisées. Dans le contexte actuel national et européen du regroupement des animaleries dans de grandes structures mutualisées et de statut sanitaire contrôlé, le but de ce projet est donc d'étudier les effets des conditions d'hébergement et de mise en oeuvre de plusieurs tests comportementaux dans le cadre d'une animalerie centralisée (ACE) dont le statut sanitaire (Exempt d'Organismes Pathogènes Spécifiques, EOPS) est plus contraignant comparativement à ceux des conditions rencontrées dans une animalerie conventionnelle (ACO) où ces tests sont habituellement pratiqués et d'établir l'impact des différentes conditions d'environnement sur les

résultats des tests utilisés et leurs capacités à détecter les effets modulateurs du comportement d'agents pharmacologiques connus. Le projet nécessitera l'utilisation de 160 rats mâles adultes du même âge provenant du même fournisseur répartis en 2 lots de 80 animaux chacun, un lot étant hébergé dans l'ACE et l'autre dans l'ACO. Les animaux seront hébergés dans les deux structures dans les conditions qui leur sont propres compte-tenu du statut sanitaire différent des 2 animaleries (statut EOPS et portoirs ventilés dans le cadre de l'ACE, statut conventionnel et cages ouvertes dans le cadre de l'ACO), les conditions d'ambiance (température, hygrométrie, cycle lumineux) étant les mêmes dans les 2 cas. Les personnels en charge de la réalisation des tests comportementaux seront les mêmes dans les 2 animaleries de manière à limiter les facteurs de variation entre les 2 structures et les réduire le plus possible aux seules conditions d'hébergement et d'environnement des tests réalisés.

Dans chaque structure, les lots de 80 rats seront organisés en 4 lots de 20, chaque lot étant dédié à la réalisation de 2 tests comportementaux choisis et connus pour explorer chacun des aspects spécifiques du registre comportemental du rat. Le 1er lot de 20 rats sera dédié à l'étude du comportement dans un open-field (mesure de l'activité locomotrice) et un labyrinthe en croix surélevée (mesure du niveau d'anxiété). Le 2e lot sera dévolu à l'étude du niveau d'anxiété dans les tests de la boîte claire-obscur et de l'enfouissement conditionné, ce 2e test permettant d'étudier en plus la persistance ou pas de la réponse conditionnée apprise. Les animaux du 3e lot seront étudiés au plan de leurs performances d'apprentissage et de mémorisation dans le labyrinthe en Y (mémoire à court terme) et le labyrinthe radial à 8 branches (mémoire spatiale). Enfin, le 4e lot de 20 rats visera à étudier le comportement social des animaux dans le test résident-intrus et leurs performances cognitives dans un test de reconnaissance d'objet. Pour le test résident-intrus, les animaux du 1er lot seront utilisés comme congénères vis-à-vis des rats du 4e lot objet de l'étude.

Pour chacun de ces tests, les animaux seront divisés en 2 groupes de 10 rats chacun, un groupe recevant l'administration d'un agent pharmacologique connu pour ses propriétés modulatrices du comportement vis-à-vis du labyrinthe considéré (caféine en tant que psychostimulant dans l'open-field, diazépam en tant qu'anxiolytique dans le labyrinthe en croix surélevée, la boîte claire-obscur, l'enfouissement défensif conditionné, le test résident-intrus, scopolamine en tant que produit amnésiant dans le labyrinthe en Y, le labyrinthe radial à 8 branches et le test de reconnaissance d'objet), les autres 10 rats étant administrés avec le véhicule et considérés ainsi comme témoins. Les résultats obtenus seront analysés en fonction de 2 sources de variation que sont les conditions d'hébergement et de mise en oeuvre des tests liés à l'animalerie et le traitement pharmacologique. Par rapport aux principes de la règle des 3R, le recours à l'animal pour réaliser ce type d'expérimentation ne peut pas être substitué par des systèmes virtuels ou cellulaires, le but du projet étant d'étudier l'influence des conditions d'environnement sur l'expression de différents registres comportementaux du rat (Remplacement). Le nombre d'animaux requis pour ce projet dans l'ACE objet de cette saisine est de 80 rats qui seront organisés et utilisés en lots expérimentaux comme décrit ci-dessus dans le but de limiter le nombre de rats utilisés (Réduction) tout en assurant la pertinence des résultats qui seront obtenus (Raffinement). Les rats seront maintenus dans des conditions d'hébergement standardisées telles que prescrites par la réglementation dans les 2 établissements, tous deux agréés en matière d'expérimentation animale, et surveillés quotidiennement par du personnel certifié et formé (Raffinement). Les points limites mentionnés dans la saisine relatifs à un état de mal-être persistant seront relevés (perte de poids corporel supérieure à 10% du poids de départ, perte de poids >20% sur 3 jours, état de stress apparent de l'animal se maintenant suite à la manipulation (maintien d'un comportement agressif, cris récurrents), tout signe de lésion suite à l'administration des substances pharmacologiques utilisées lors des tests (saignement, difficulté respiratoire et/ou cardiaque), signes comportementaux anormaux (prostration, hyperactivité, signes d'agressivité vis-à-vis des congénères). Les rats engagés dans ce projet seront conservés et pourront être utilisés dans le cadre d'autres actions de formation sur avis du personnel des EUs et leurs structures en charge du bien-être animal, complété par l'avis des vétérinaires référents. Ils ne seront mis à mort selon une méthode réglementaire qu'en dernier recours.

14971 Le cancer est la deuxième cause de décès dans les pays développés après les maladies cardiovasculaires. Les traitements conventionnels de nombreux cancers tels que la radiothérapie, la chimiothérapie et la chirurgie ont démontré des limites d'efficacité nécessitant un besoin urgent de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Les virus oncolytiques ou virus qui détruit les cellules tumorales sont une nouvelle classe d'agent thérapeutique pouvant être une alternative au traitement des cancers. Par définition, un virus oncolytique est un virus qui démontre une réplication spécifique dans les cellules tumorales induisant leur destruction, avec une faible voire aucune cytotoxicité sur les tissus dits « sains ».

La perspective de ce projet est d'évaluer l'efficacité et l'innocuité (absence de toxicité) de ces nouveaux vecteurs pour traiter des pathologies.

En premier lieu, la tolérance de ces nouveaux vecteurs sera déterminée. Puis, nous vérifierons la présence de ces vecteurs dans différents tissus sains avec une expérimentation de biodistribution.

Les effets secondaires dus à l'injection des virus seront surveillés et des critères d'interruption de l'expérimentation en fonction de l'aspect clinique moribond des animaux seront mis en place pour limiter le stress et la souffrance des animaux. Du fait de l'absence de système *in vitro* comportant tous les éléments cellulaires pouvant interférer avec la réplication virale, et permettant de mimer leurs interactions et leur mode d'action, l'emploi de modèle animal est incontournable.

Les résultats de sur la détermination de la dose non toxique et de biodistribution obtenus dans ce protocole nous permettront de déterminer par la suite la dose sub-létale dans les protocoles d'expérimentation thérapeutique. Ces virus seront injectés dans des souris porteuses de tumeurs murines ou humaines (implantées soit en souris immunocompétentes, soit en souris immunodéficientes) afin de déterminer *in vivo* l'activité thérapeutique anti-tumorale de nouvelles générations de virus oncolytiques.

Pour les expériences que nous mènerons nous serons vigilants à mettre en œuvre la règle des 3R

- Réduire le nombre de souris utilisées avant d'être testés chez l'animal, ces virus candidats médicaments auront été évalués *in vitro* sur des modèles cellulaires de tumeurs humaines et murines établies et caractérisées, ainsi que dans des cellules primaires (non tumorales) pour sélectionner les virus-candidats médicaments ayant une activité antitumorale et ne présentant pas de cytotoxicité.

- Remplacer du fait de l'absence de système *in vitro* comportant tous les éléments pouvant interférer avec la réplication virale, et permettant de mimer leurs interactions et leur mode d'action, l'emploi de modèles animaux est incontournable. Un nombre maximal de 1220 souris est envisagé pour ce projet.

- Raffiner Tout au long de leur vie, une attention particulière est portée au bien-être des animaux en particulier par un enrichissement de leur milieu de vie qui leur permet d'assouvir les comportements liés à leur espèce, tel que du matériel de nidification. Les animaux sont hébergés en groupes sociaux pendant toute la durée des expérimentations. Ces expérimentations sont réalisées par des techniciens rompus à ses manipulations afin de garantir la bonne reproductibilité des expériences et un suivi optimal du bien-être des animaux.

Les procédures expérimentales seront arrêtées le plus précocement possible sur la base de points limites permettant de réduire le stress et la souffrance de l'animal.

14972 Le Test de Nage Forcée (FST, pour Forced Swimming Test), est un test de comportement populaire pour le développement et le screening d'antidépresseurs et de drogues anxiolytiques afin d'identifier de nouveaux traitements et comprendre les mécanismes biologiques des traitements existants.

Le test est réalisé sur des souris. Une étude standard comprend 60 animaux répartis en 5 groupes de 12 sujets, qui reçoivent le produit testé à 3 doses, un produit de référence et un placebo. Des études peuvent comprendre un nombre plus élevés ou plus faible d'animaux (par exemple pour l'étude d'un nombre de doses supérieur ou inférieur).

Le nombre maximum de produits testés par an est de 10.

Le nombre total maximum d'animaux utilisées sur 5 ans est de $3\ 000 = 60 \text{ animaux/étude} \times 10 \text{ études/an} \times 5 \text{ ans}$.

Respect de la règle des 3R

- Réduire. Le nombre total d'animaux utilisés pour une étude est fonction du nombre de groupes et du nombre d'animaux par groupe nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement interprétables.

- Justification du nombre de groupes. Le groupe témoin est nécessaire à chaque expérience compte tenu des variations de performances entre lots d'animaux. Le groupe produit de référence est nécessaire pour valider l'expérience et pour comparer l'efficacité du produit testé à un produit de référence. Il est généralement nécessaire de tester le produit à trois doses pour mesurer la relation dose-effet, mais un nombre de doses inférieur ou supérieur peut être justifié en fonction de l'état de connaissance du produit.

- Justification du nombre d'animaux par groupe. Compte tenu de la variabilité interindividuelle des variables mesurées dans ce test, ce nombre a été fixé à 12 animaux par groupe. L'utilisation d'un nombre inférieur d'animaux a une probabilité importante d'entraîner la non-validité de l'étude, conduisant à la refaire, et par conséquent à utiliser un nombre d'animaux plus élevé.

- Raffiner. Des animaux présentant des signes de souffrance sont euthanasiés. Outre la motivation éthique conduisant à cette euthanasie, celle-ci est requise pour des raisons expérimentales, la souffrance d'un animal biaisant les variables comportementales mesurées. L'utilisation de traitements pour pallier à cette souffrance est exclue, ces types de traitement étant susceptibles de modifier le comportement des animaux et l'action pharmacologique des produits étudiés.

- Remplacer. Il n'existe pas à ce jour de modèle n'utilisant pas d'animaux ou nécessitant un nombre plus réduit d'animaux ou ayant un degré de sévérité inférieur permettant d'obtenir des informations équivalentes à celles obtenues par le présent modèle.

14973 Le traitement de nombreuses pathologies cancéreuses ou bénignes nécessite, en complément d'un traitement médicamenteux, de la chirurgie.

La chirurgie conventionnelle passant par une ouverture cutanée, et communément appelée chirurgie ouverte, présente des risques pour le patient. En effet un temps de récupération long, des douleurs post opératoires intenses et une augmentation du risque infectieux sont les inconvénients majeurs d'une telle intervention.

Depuis de nombreuses années des techniques dites mini invasives, comme la coelioscopie, se développent. Cette technique, devenue depuis un standard en chirurgie, présente un avantage majeur, celui de diminuer les contraintes rencontrées en chirurgie ouverte, mais présente certaines limites.

Lors d'une intervention chirurgicale coelioscopique, les instruments utilisés sont totalement rigides, dépourvus d'articulation, et l'endoscope (caméra) qui permet la vision sera contrôlé, non pas par le chirurgien opérateur, mais par un tiers. Durant toute la totalité de l'intervention chirurgicale, le chirurgien sera debout au-dessus du patient dans une position inconfortable ce qui pourrait avoir un impact sur la concentration et l'état général de ce dernier.

Voilà pourquoi une nouvelle forme de chirurgie mini invasive a vu le jour, la chirurgie mini invasive robotique assistée. Cette dernière approche va combiner les avantages des deux autres et en apporter de nouveaux. Le chirurgien va travailler assis à une console, avec une vue en trois dimensions, contrôlant des instruments complètement articulés et cela en toute autonomie.

Aujourd'hui, les chirurgiens qui souhaitent accéder à la robotique doivent se former.

Il existe du personnel qualifié en robotique travaillant dans des centres spécialisés qui permettent la prise en main de ces nouveaux dispositifs et proposent différents modèles de chirurgie.

Après des phases de formation en simulation virtuelle, sur modèles en plastique, il reste une étape indispensable pour que ces chirurgiens soient prêts à opérer des patients. Afin de leur permettre de réaliser une intervention en toute sécurité sur l'Homme, une formation technique sur tissus vivants est nécessaire voir incontournable.

En effet des applications comme l'utilisation d'énergie visant à coaguler un vaisseau, disséquer ou exposer un tissu n'ont de sens que sur un modèle vivant. Le modèle porc a été retenu du fait de sa taille adaptée aux instruments laparoscopiques et son homologie anatomique avec l'homme.

Ainsi 3000 animaux seront nécessaires pour ce projet de formation sur 5 ans, pour former tous les chirurgiens des établissements hospitaliers qui s'équipent en chirurgie robotique assistée en Europe et ailleurs.

Les animaux seront utilisés dans le respect de la règle des 3Rs

Remplacement Les premières phases de formation se feront par l'utilisation de méthodes alternatives (simulation virtuelle, modèle en plastique). Une fois le chirurgien prêt, il évoluera vers un apprentissage technique sur animal en suivant un protocole strict. L'enseignement comprend aussi des sessions sur sujet anatomique afin de compléter les objectifs de formation.

Réduction Le nombre de porcs sera réduit au minimum, à raison d'un animal par binôme avec une optimisation de chaque animal sur lequel plusieurs gestes chirurgicaux par temps opératoire pourront être effectués.

Raffinement Les porcs sont préalablement hébergés en groupe sociaux selon la réglementation en vigueur, ils disposent d'enrichissements leur permettant d'exprimer leurs comportements naturels comme le fouissage, l'exploration d'objets à mâchouiller, le repos sur une aire dédiée. Une surveillance et des soins quotidiens sont apportés par une équipe qualifiée de techniciens et vétérinaires.

Le protocole prévoit des procédures mini-invasives réalisées sous anesthésie générale par un chirurgien sous la supervision d'un formateur qualifié.

Tous les animaux seront soumis à des procédures sans réveil.

Toute anomalie pouvant impacter le bien-être des animaux est signalée à la SBEA et au vétérinaire désigné qui prendra les dispositions de soins nécessaires.

14974 Les trypanosomes africains sont des parasites unicellulaires flagellés transmis aux mammifères par la piqûre infectante de la glossine ou mouche tsétsé. Ils prolifèrent dans le sang de leur hôte et sont responsables de la maladie du sommeil chez l'homme et du nagana chez de nombreux mammifères domestiques et sauvages. Grâce aux importants efforts de nombreux acteurs de santé publique durant les 20 dernières années, le nombre de nouveaux cas de maladie du sommeil rapportés n'a jamais été aussi bas (<1500 cas en 2017) et l'OMS cible l'élimination de la maladie pour 2030. Dans ce contexte, de nouveaux outils de diagnostic / détection des parasites plus spécifiques et surtout plus sensibles sont nécessaires afin de garantir et de valider cette élimination. Dans ce but, nous souhaitons développer une approche de détection des trypanosomes dans les fluides corporels dérivée de la méthode récente des ciseaux moléculaires (CRISPR-Cas). Pour en effectuer la mise au point, des échantillons d'ARN de différentes espèces et souches de trypanosomes sont nécessaires. Or, les différentes espèces et souches en question, pour certaines fraîchement isolées d'animaux, ne sont malheureusement pas cultivables *in vitro* et nécessitent donc un passage chez un hôte rongeur de laboratoire pour être amplifiées.

Dans le cadre d'une unique procédure de classe de sévérité modérée, un maximum de 50 souris BALB/c mâles et femelles adultes seront incluses dans un protocole expérimental déjà publié et sur une durée totale de 5 ans.

Après sensibilisation par injection intra-péritonéale d'un immunosuppresseur, les souris seront infectées par injection intra-péritonéale d'une souche de trypanosomes. La prolifération des parasites sanguins sera suivie tous les deux jours pendant au maximum 21 jours par observation microscopique d'un prélèvement sanguin. Environ 6 à 12 jours après infection, donc avant l'apparition des symptômes de la maladie, la densité des parasites sanguins devrait atteindre la quantité souhaitée. Les souris seront mises à mort, un maximum de sang sera prélevé post-mortem dans le cœur, puis les parasites sanguins seront soit congelés soit directement traités pour extraction de leur matériel génétique (ici l'ARN).

D'après la littérature disponible sur les souches de parasites en question et nos expériences préliminaires (1) les symptômes de la maladie ne s'installent chez la souris qu'après au moins 3 semaines et (2) la mort ne survient qu'à partir de 5 à 8 semaines. Dans nos conditions d'observation d'une durée maximum de 3 semaines, aucun symptôme évident n'est donc attendu. Le nombre de souris (au maximum 10 souris par souche pour 5 souches, soit un maximum de 50 souris au total) a été calculé pour obtenir la quantité minimale de parasites nécessaire en vue d'extraire la quantité minimale de matériel génétique requise pour la mise au point du nouveau test de diagnostic moléculaire de la maladie du sommeil. Tous les individus seront hébergés dans des conditions optimales en portoirs ventilés avec enrichissement et des doses de DietGel seront mises à disposition continuellement en vue de prévenir toute déshydratation. Après le prélèvement final de sang, un petit volume de sang sera également utilisé pour tenter une adaptation des souches en culture *in vitro* en vue de tenter de s'affranchir des passages *in vivo* dans le futur.

14975 La myasthénie grave est une maladie auto-immune rare. Elle est liée à la production d'auto-anticorps dirigés essentiellement contre le récepteur à l'acétylcholine, situé sur la membrane post-synaptique à la jonction neuro-musculaire. Ces auto-anticorps altèrent la transmission de l'influx nerveux entre le nerf et le muscle conduisant à des faiblesses musculaires plus ou moins invalidantes. Il n'existe actuellement aucun traitement curatif pour la myasthénie. Les traitements actuels proposés aux patients sont essentiellement symptomatiques ou non-spécifiques et doivent être pris à vie.

Les PhosphatidylSérine Liposomes (PS-L) correspondent à une nano-technologie innovante développée dans l'objectif de traiter les maladies auto-immunes. Des tests *in vitro* ont montré une diminution de prolifération de lymphocytes auto-réactifs, une régulation des cytokines inflammatoires et une augmentation de la prolifération de lymphocyte T régulateurs. Des expérimentations *in vivo* sur des modèles murins mimant le diabète de type 1 ou la sclérose en plaque montrent une grande efficacité des PS-L contenant l'auto-antigène à réduire significativement les symptômes associés à la maladie. Ces résultats ont permis de mettre en évidence le potentiel des PS-L comme traitement thérapeutique pour deux maladies auto-immunes. Le seul moyen pour pouvoir déterminer le pouvoir thérapeutique de cette nano-technologie dans la myasthénie auto-immune est d'effectuer une étude pré-clinique et d'évaluer l'effet des PS-L dans le modèle animal de la myasthénie.

Il existe un modèle animal de la myasthénie induit par l'injection de récepteur à l'acétylcholine (RACH) purifié à partir d'organes électriques de poissons torpilles. Ce modèle permet d'évaluer les effets de nouveaux traitements. Nous voulons donc analyser les effets des PS-L sur le modèle expérimental de la myasthénie chez la souris. Les expériences comprendront différents lots de souris induites pour la myasthénie et traitées avec des PS-L contenant soit un peptide correspondant à la sous-unité RACH- α (auto-antigène majeur impliqué dans la myasthénie) ou des PS-L vides (placebo). Nous estimons avoir besoin de 88 souris C57bl/6 pour ce projet. Ce chiffre ainsi que toute la démarche scientifique a été établi afin de respecter la règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer) et obtenir des résultats statistiquement significatifs avec le moins de souris possible. Le raffinement des expériences est assuré par la mise en place de points limites pour éviter l'inconfort et la douleur des souris. De plus, toutes les dispositions visant à prévenir le stress (ex utilisation du Sizzle nests, cycle jour/nuit de 12h) et la douleur (ex analgésie pour réduire la douleur) seront mises en œuvre.

Le but de ce projet de recherche est d'évaluer l'efficacité des PS-L/RACH- α dans le traitement de la myasthénie induite chez la souris. Cette étape est nécessaire avant de proposer des essais cliniques sur l'homme.

14976 L'allergie à l'insuline est une complication rare mais qui pose de sérieux problèmes pour la prise en charge des patients diabétiques de type 1 ou de type 2 (prévalence estimée à 2%). Les manifestations allergiques incluent urticaire, éruption cutanée, œdèmes, hypotension, difficultés respiratoires et réactions anaphylactiques dans les cas extrêmes et se produisent immédiatement après l'injection d'insuline. Les traitements actuels consistent en l'utilisation d'agents anti-

histaminiques, de corticoïdes, mais également la sélection de préparations d'insuline moins allergènes et des pompes à insuline intrapéritonéale plus invasives.

Notre objectif est d'évaluer l'effet thérapeutique d'une nouvelle stratégie visant à moduler l'activation des cellules immunitaires responsables des réactions allergiques. Nous testerons l'administration orale d'une molécule composée d'insuline « déguisée » en anticorps (appelée PPI-Fc), qui peut traverser la barrière intestinale après fixation sur son récepteur présent à la surface des cellules intestinales. Nous utiliserons un modèle de souris « humanisées » afin de reproduire l'interaction entre la PPI-Fc et son récepteur humain. La procédure expérimentale impliquera l'induction d'une réaction allergique cutanée par application d'insuline sur la peau de la souris (mimant ce qui se passe chez les patients diabétiques au niveau du site d'injection de l'insuline). Cette sensibilisation se fera sous anesthésie générale pour induire une réaction localisée. Le traitement oral avec la PPI-Fc devrait diminuer les réponses allergiques.

Au total, nous estimons à 200 le nombre de souris nécessaires à ce projet sur 5 ans. Afin de respecter la règle des 3R, le nombre de souris utilisées par expérience sera réduit au minimum permettant de déterminer de manière fiable, robuste et statistique l'effet thérapeutique des approches proposées. Ces expérimentations sur l'animal ne peuvent pas être substituées par des approches *in vitro* qui ne reproduisent pas les différents stades de développement de la réponse allergique. Toutefois, elles seront complétées par des tests *in vitro* pour mieux comprendre les mécanismes en jeu. Une attention particulière sera portée au bien-être animal par l'utilisation de méthodes d'anesthésie générale et par un suivi pluri-hebdomadaire des souris basé sur des points limites définis, entraînant si nécessaire, la mise à mort anticipée de l'animal.

A terme, les résultats de ce projet permettront d'établir le potentiel thérapeutique de notre PPI-Fc orale qui pourra être appliqué en clinique pour le traitement des patients diabétiques présentant une allergie à l'insuline.

14977 L'hypertension portopulmonaire (HTPoP) et le syndrome hépatopulmonaire (SHP) sont deux maladies respiratoires fréquentes et qui ont un impact majeur sur la survie des patients. Le SHP se caractérise par une dilatation et la prolifération des petits vaisseaux pulmonaires, à l'origine d'une altération sévère des échanges gazeux. L'HTPoP est quant à elle associée à une muscularisation des artérioles pulmonaires aboutissant à une élévation des pressions pulmonaires. Le manque de connaissance sur les mécanismes impliqués dans le développement de ces maladies explique l'absence de traitement curatif. A l'aide d'études *in vitro*, nous avons récemment pu montrer que les protéines osseuses morphogénétiques (appelées également BMP) jouent des rôles importants pour le bon fonctionnement des vaisseaux. Comme ces facteurs sont perdus dans l'HTPoP et le SHP, notre hypothèse est que la restauration de leurs niveaux pourrait constituer une nouvelle approche thérapeutique pour ces 2 maladies. Comme ces maladies sont complexes et font intervenir plusieurs types cellulaires et des interactions entre foie-cœur-poumons, seuls les modèles animaux pourront nous aider à valider nos données *in vitro* qui montrent que la perte de ces facteurs BMP perturbe les fonctions endothéliales. Pour cela, nous rétabliront le niveau des BMP dans le modèle de ligature du canal cholédoque à l'aide de molécules spécifiques utilisées en clinique et qui ne sont pas connues pour induire de douleur. Néanmoins, le bien-être animal sera surveillé par un suivi quotidien des rats à l'aide d'un score (apparence, poids et comportement). Afin de réduire au minimum le nombre de rats utilisés, un calcul de l'effectif optimal tenant compte de la puissance et de la dispersion des données (Power 90% Significance 0.05, Delta/Ecart type = 1) a été effectué et prévoit l'utilisation de 290 rats pour le projet.

14978 Le cortex cérébral contrôle la perception sensorielle ainsi que les fonctions motrices et cognitives et joue donc un rôle essentiel dans le fonctionnement du cerveau des mammifères. La mise en place de cette structure au cours du développement embryonnaire nécessite une coordination très fine de la génération des différents types cellulaires, du contrôle de leur migration et de leur positionnement final.

Les anomalies de développement du cerveau sont à l'origine de plusieurs pathologies neurologiques et psychiatriques telles que l'épilepsie, la schizophrénie ou l'autisme. Il est de plus

en plus reconnu que l'élimination des cellules neuronales est un processus essentiel pour le développement du cortex cérébral. Il a été montré qu'une première série de neurones du cortex, les cellules de Cajal Retzius, migrent pendant la gestation sur de grandes distances et meurent peu après la naissance chez les rongeurs. Chez l'homme, le maintien de ces cellules au stade adulte, est associé à diverses pathologies caractérisées par des crises d'épilepsie.

Il existe un modèle murin (souris) dans lequel une sous-population de ces neurones persiste, ce qui altère la mise en place des réseaux neuronaux. Ce projet vise à étudier les conséquences de la survie anormale de ces neurones sur le comportement avec l'aide de différents tests de comportement (test de mémoire ou d'anxiété), nous pourrions évaluer la fonction de ces neurones chez ces souris et la survenue d'épilepsies (par injection d'une molécule épiléptogène) dans ce modèle.

A l'heure actuelle, il n'existe pas de méthode de remplacement permettant de reproduire *in vitro* la complexité du cortex en développement, ce qui rend l'utilisation d'un modèle murin indispensable à la réalisation de ce projet. De plus, le cerveau de ces animaux se forme de manière très similaire aux autres mammifères.

Durant les 2 années que dure ce projet nous allons utiliser au total 160 animaux adultes.

L'utilisation de l'expérimentation animale pour nos travaux est rendue nécessaire par la complexité de l'environnement cortical qui ne peut pas être recréé par des approches *in vitro*. Toutefois, dans le respect de la règle des « 3R », nous diminuerons au maximum le nombre d'animaux expérimentés tout en atteignant la significativité statistique. Nous veillerons en continu au bien-être des animaux par l'utilisation d'analgésiques et d'anesthésiques lors des procédures opératoires et par un enrichissement de leur environnement dans les cages d'hébergement.

A terme, les résultats de ces travaux pourront nous permettre de mieux comprendre le rôle de nos cellules d'intérêts dans le développement cortical chez la souris mais aussi d'appréhender leur importance dans l'apparition d'épilepsie et de pathologies neurologiques.

14979 Chaque année, en France, 50.000 personnes sont victimes d'un arrêt cardiaque. Même lorsqu'une réanimation peut être mise en place rapidement, la mortalité reste considérable et seulement 5% des patients survivent avec une bonne récupération neurologique. Expérimentalement, cette récupération peut être améliorée lorsqu'une hypothermie ultra-rapide est mise en place précocement au décours de l'agression ischémique, avant « l'installation » d'une défaillance multiviscérale. Pour cela, un nouveau prototype de ventilateur liquidien a été conçu très récemment afin d'induire un refroidissement ultra-rapide chez le porc en instillant des liquides « biocompatibles dans les poumons ».

Dans ce projet, nous proposons d'évaluer la faisabilité et la tolérance d'une ventilation liquidienne hypothermisante chez le porc mais aussi de tenter de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques d'un refroidissement ultra-rapide. Pour ce faire, nous nous intéresserons plus particulièrement à l'effet de l'hypothermie ultra-rapide sur la réaction inflammatoire dans un modèle de défaillance multiviscérale post-arrêt cardiaque.

Pour conduire ce travail, l'usage de l'expérimentation animale ne peut pas être évité puisqu'il s'agit de l'évaluation préclinique d'un dispositif médical dans un contexte qui doit prendre en compte l'ensemble des interactions entre les organes après un arrêt cardiaque (cœur, cerveau, etc). Cette situation ne peut pas être mimée *in vitro* et il n'existe aucune méthode alternative (absence de Remplacement possible). L'étude sera réalisée chez des porcs qui constituent l'espèce de référence pour la recherche sur l'arrêt cardiaque. Nous utiliserons 52 animaux. Nous avons estimé le nombre d'animaux minimum pour pouvoir mettre en évidence un éventuel effet, tout en réduisant autant que possible l'usage d'animaux (Réduction). A toutes les étapes susceptibles d'être à l'origine d'une douleur, les animaux feront l'objet d'une anesthésie ou d'une analgésie avec des antalgiques puissants (Raffinement).

14980 La mort subite par arrêt cardiaque est un problème de santé publique majeur. Le taux de survie dans les suites d'un arrêt cardiaque est faible et les patients réanimés présentent de façon quasi

systematique des troubles neurologiques irréversibles. Malgré les progrès des techniques de réanimation cardio-pulmonaire, il a été démontré que la reperfusion cérébrale entraîne des troubles neurologiques précoces et diffus, irréversibles dans la majorité des cas. La cinétique de constitution d'un accident ischémique cérébral (AIC) est mieux connue et la reperfusion chimique et mécanique donne des résultats satisfaisants jusqu'à plusieurs heures après l'occlusion artérielle.

Il y a donc une discordance non élucidée entre la constitution de l'ischémie cérébrale territoriale d'une part et les lésions neurologiques qui résultent d'un arrêt circulatoire global avec ressuscitation d'autre part. Les dommages cérébraux résultent à la fois de la phase d'ischémie puis de la phase de reperfusion. Les paramètres de reperfusion semblent avoir un impact sur le caractère réversible ou non des dommages cérébraux. Certaines études ont d'ailleurs démontré la possibilité de restauration ad integrum des capacités cardiaques et neurologiques post ressuscitation après 30 minutes d'arrêt circulatoire.

Les modifications spatiales et temporelles du tissu cérébral après un arrêt cardio-respiratoire restent cependant mal comprises. L'hypothèse est que le parenchyme cérébral est capable de développer de façon précoce un réseau de collatéralité lors d'un AIC. La perfusion qui en résulte diminuerait les modifications architecturales et physiologiques cellulaires et augmenterait la réversibilité de l'atteinte ischémique.

Dans ce contexte, notre projet propose d'étudier comparativement, par des modalités d'imagerie IRM, l'évolution temporelle de l'atteinte du parenchyme cérébral lors d'un AVC ischémique et d'une mort subite chez le porc la cinétique de constitution de l'ischémie cérébrale d'une mort subite différente ou se rapproche-t-elle de celle d'un AIC ?

La Stroke Therapy Academic Industry Roundtable (STAIR) recommande l'étude et la thérapie sur un modèle animal dont l'anatomie cérébrale se rapproche de l'homme, notamment la présence d'un gyrencéphale, comme le porc.

Afin de réaliser ces expérimentations, 12 porcs seront nécessaires pour comparer, à l'aide de l'imagerie par IRM, la cinétique de constitution de l'ischémie résultant d'un arrêt cardio-respiratoire dans le premier groupe et d'une occlusion artérielle cérébrale dans le second groupe.

Ce projet est conçu dans le respect de la règle des 3 Rs

Remplacement l'évaluation de la constitution précoce de l'ischémie cérébrale au cours du temps ne peut être réalisée qu'*in vivo* d'où la nécessité d'utiliser des animaux. Le modèle porcin est choisi en raison de la grande proximité anatomique entre le parenchyme cérébral de l'homme et celui du porc, autorisant l'utilisation d'une IRM 1,5T avec antenne dédiée pour l'exploration du parenchyme cérébral.

Réduction le nombre d'animaux prévu dans ce projet est réduit au minimum avec un objectif fixé afin d'obtenir des résultats significatifs permettant de conclure sur la pertinence de notre approche. Pour ce faire, un suivi précoce prédéterminé par imagerie IRM est réalisé afin de limiter au maximum le nombre d'animaux sacrifiés tout en obtenant des résultats pertinents sur la constitution de l'ischémie cérébrale lors d'un arrêt cardio-respiratoire et d'une occlusion artérielle cérébrale.

Raffinement les animaux seront surveillés dans des conditions adaptées à l'espèce, dans les heures suivant l'arrêt circulatoire ou l'occlusion artérielle avant l'euthanasie des modèles animaux. Par ailleurs, l'ensemble des procédures se déroule sous anesthésie générale afin d'éviter tout stress et toute souffrance.

14981 Le système immunitaire est un ensemble de mécanisme de défense qui permet de lutter contre des agents pathogènes (virus, bactéries, cellules cancéreuses). Néanmoins dans le cas de cancers, ces mécanismes n'arrivent pas jouer leur rôle de défense et sont débordés par la multiplication rapide de ces cellules tumorales.

Les mécanismes qui régulent la production des différentes cellules du système immunitaire restent mal connus, mais il a été montré que dans les cancers du sang (leucémies) les cellules immunitaires avaient de fréquentes altérations suggérant que celles-ci jouent des rôles physiologiques et physiopathologiques majeurs.

La protéine Ets-1 est l'une des protéines essentielles pour le développement normal de différentes populations de cellules du système immunitaire. Elle joue également un rôle dans le développement anormal des cellules sanguines dans le cadre des leucémies.

Notre projet de recherche vise donc à comprendre plus précisément le rôle de cette protéine dans le développement normal mais également lors de la production des cellules tumorales. Il permettra de caractériser les processus qui contrôlent la mise en place du système immunitaire et de définir de nouvelles cibles thérapeutiques dans les maladies du système immunitaire et en particulier dans les leucémies.

Pour cela, nous disposons de souris génétiquement modifiées n'exprimant plus la protéine Ets-1. L'absence totale de cette molécule étant létale chez la souris dans les premiers jours de vie, nous utilisons des animaux ayant seulement 50% de cette protéine qui est produite. Dans ce cas, les souris se développent parfaitement, sont fertiles et ne présentent aucune anomalie témoignant d'une souffrance. Afin d'étudier spécifiquement le rôle de la protéine Ets-1 et de nous affranchir de la létalité des animaux dépourvus de cette molécule, nous avons développé un modèle expérimental *in vivo* consistant à injecter des cellules dépourvues totalement de la protéine d'intérêt. Nous obtenons ces cellules à partir du foie d'embryons de souris issus de l'accouplement de souris exprimant 50% de Ets-1.

L'administration de ces cellules est non douloureuse et est réalisée sur souris éveillées. Elle est faite soit par voie intra-veineuse à des souris immunodéficientes adultes (sans système immunitaire afin qu'un système immunitaire dérivé des cellules injectées puissent se développer) soit par voie intra-hépatique à des souris nouveau-nés âgés de 2 à 4 jours. Dans ce dernier cas, nous sommes vigilants à ce que les souriceaux ne soient pas rejetés par leur mère en réduisant au maximum le temps de la séparation avec la mère et en les remettants dans leur environnement de départ. Une vigilance supplémentaire est mise en place dans les heures qui suivent leur manipulation. L'ensemble des souris obtenues dans ce protocole expérimental sont analysées au cours du temps pour le développement du système immunitaire normal ou pour le développement de tumeurs.

Ce projet de recherche s'inscrit dans le respect de la règle des 3 R. En effet, afin de remplacer l'utilisation systématique des souris, nous avons réalisé le maximum de tests *in vitro* avant de passer sur l'animal. Cependant le recours à un modèle animal est maintenant nécessaire afin d'analyser ces processus complexes de développement cellulaire et de progression tumorale dans un système physiologique qui tient compte de l'environnement dans lequel ces cellules se développent. Nous nous attachons à réduire le nombre d'animaux au maximum (1450 souris sur 5 ans) Néanmoins la population de cellules d'intérêt pour nos travaux de recherche ne représente que 10% des cellules totales. Nous devons disposer d'un nombre minimum d'animaux pour nos tests *ex vivo*, c'est pourquoi nous injecterons en moyenne chaque mois 20 souris au maximum en fonction de nos besoins, soit un total maximum de 1200 souris sur 5 ans. Il est bien entendu que le nombre de souris greffées par mois est modulé en fonction des besoins afin de réduire au maximum l'utilisation des animaux et de privilégier l'utilisation des ceux déjà greffé.

A ce nombre s'ajoutent 250 souris immunodéficientes (adultes ou nouveaux nés) dans lesquelles les cellules injectées auront été préalablement modifiées pour la production d'une protéine ayant une activité sur le développement des cellules du système immunitaire, afin d'étudier le développement tumoral de ces cellules. Le nombre d'animaux par groupe d'étude (8 modifications, 30 souris par modification [15 à partir de cellules exprimant Ets-1 et 15 à partir de cellules n'exprimant pas Ets-1]) a été défini afin d'obtenir une puissance statistique suffisante pour conclure à partir des résultats obtenus sur nos protocole *ex vivo*. Dix animaux supplémentaires sont ajoutés pour palier à la non prise de greffe, au rejet possible d'une portée par la mère.

Le suivi des animaux sera quotidien et effectué dans le respect du bien-être animal par l'expérimentateur, en complément de celle faite par le personnel de l'animalerie. Il sera assuré en utilisant une grille d'évaluation prenant en compte l'apparence physique et le comportement des animaux. Nous avons ainsi défini des critères d'arrêt précoce, qui lorsqu'ils sont atteints conduisent à l'euthanasie de la souris. Les souris seront euthanasiées au plus tard 6 mois après le début de la procédure ou plus tôt si un animal présente une souffrance définie par l'atteinte d'un point limite.

14982 Les troubles du rythme cardiaque constituent un risque majeur de mort subite chez les patients atteints de ce syndrome que ce dernier acquis soit secondairement à une autre pathologie du cœur comme l'infarctus ou causé par une anomalie génétique. Récemment des chercheurs ont mis en évidence le rôle d'une voie de signalisation utilisant un métabolite le NAD qui stimule l'activité du canal ionique Nav1.5, un canal laissant entrer les ions sodium dans les cellules cardiaques, réprimé dans certaines formes de troubles du rythme. Augmenter le taux de ce métabolite dans le cœur pourrait avoir des effets anti-arythmiques bénéfiques pour certains patients.

L'objectif de ce projet est de tester cette hypothèse dans un modèle de souris transgéniques surexprimant une enzyme appelée NMRK2 qui permet de stimuler la production de ce métabolite NAD dans le cœur quand leur nourriture est complétée en une vitamine B3 dont nous avons montré précédemment qu'elle est bénéfique pour plusieurs aspects de la fonction cardiaque, contractilité, métabolisme énergétique et maintenant peut-être pour stabiliser le rythme cardiaque.

L'utilisation d'animaux est indispensable pour l'évaluation du rythme cardiaque et ne peut être remplacée par des cultures cellulaires. En effet les cellules cardiaques primaires isolées en culture ne sont plus soumises à la régulation par le système nerveux sympathique et parasympathique qui régulent le rythme cardiaque. Toutes les procédures seront

pratiquées en utilisant des anesthésiques et des analgésiques et sont conçues pour respecter le principe éthique des 3R (Réduction, Raffinement, Remplacement) (i) une planification minutieuse a permis de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en préservant la validité statistique de l'étude, et en conservant une puissance statistique suffisante pour observer un effet, (ii) le rythme cardiaque est étudiée par une méthodes invasives mais non terminale permettant de limiter le nombre d'animaux puisque plusieurs mesures dans différentes conditions peuvent être effectuées sur le même animal. Ces mesures sont faites via l'implantation d'une petite électrode en sous-cutané mesurant les paramètres électriques du rythme cardiaque (electrocardiogramme) et transmettant les paramètres par télémétrie. (iii) afin de minimiser encore le nombre d'animaux utilisés, en fin d'expérimentation les tissus prélevés sont partagés entre les domaines explorés, (iv) certaines expériences complémentaires seront réalisées sur des cultures primaires. Les animaux seront surveillés quotidiennement et leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer qu'ils ne subissent aucun stress. Afin d'améliorer leurs conditions d'hébergement de l'enrichissement sera ajouté dans leurs cages. Un total de 160 souris seront nécessaires pour le projet.

14983 En France, la libre circulation des espèces animales aquatiques doit être assurée et restaurée en application de la Loi sur l'Eau et les Milieux Aquatiques (LEMA). Certains cours d'eau ont été identifiés sur la liste 2 dans l'article L.214-17 du Code de l'environnement, comme prioritaires à restaurer pour assurer la continuité écologique, et donc le rétablissement de la migration des poissons. La truite commune est notamment ciblée puisque certains individus déclenchent une migration de reproduction vers l'amont, généralement à l'automne, à la recherche de sites de reproduction favorables.

L'objectif du projet est d'évaluer le comportement des truites dans un large cours d'eau du sud de la France situé sur liste 2, au niveau d'un ouvrage transversal dont le caractère franchissable est sujet à controverse. Le passage des truites en amont de cet ouvrage est essentiel pour rejoindre les nombreux habitats de reproduction identifiés, à la fois dans le cours principal de la rivière et ses affluents.

Le projet repose sur l'utilisation d'une technique de marquage individuelle par radiotélémétrie, utilisée pour suivre à distance la position des poissons marqués à l'aide d'émetteurs radio. Des détecteurs fixes seront installés de part et d'autre de l'ouvrage pour identifier les franchissements ou les blocages d'individus au pied de l'ouvrage. En complément, un suivi des déplacements des poissons marqués sera réalisé par radiopistage de manière à évaluer les comportements individuels à plus large échelle.

Le modèle animal ne peut pas être remplacé pour répondre à la question posée (règle des 3 R Remplacement) en outre, il est indispensable d'avoir recourt à des poissons sauvages pour étudier

leur comportement en milieu naturel. Les truites seront capturées par pêches électriques, réalisées sur le secteur d'étude lors de campagnes printanières et automnales. Au total, 100 poissons seront marqués par implantation d'un émetteur radio. Il s'agit d'un effectif minimum pour obtenir un échantillon représentatif des comportements migratoires au sein de la population et pour évaluer la franchissabilité de l'ouvrage, tout en limitant au maximum les atteintes sur la population (Règle des 3R Réduction). Les émetteurs radio seront implantés chirurgicalement dans la cavité péritonéale des poissons. Les animaux seront anesthésiés avant les opérations de marquage, leurs constantes vitales seront surveillées et leur réveil post-marquage assuré avant de les relâcher dans le milieu naturel (règle des 3R Raffinement) à proximité du lieu de capture. Les manipulations d'animaux seront réalisées par du personnel formé et habilité.

14984 Des mutations de TP53 sont retrouvées dans de nombreux cancers. Dans les cancers du sang, p53 est généralement peu impliqué excepté dans certaines catégories de cancers comme les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) secondaires aux néoplasmes myéloprolifératifs (NMP).

Les néoplasmes myéloprolifératifs (NMP) sont des maladies chroniques qui sont caractérisées par une augmentation des cellules matures du sang (globules rouges, blancs, plaquettes), ils peuvent se transformer en leucémies aiguës myéloïdes (LAM), qui sont des pathologies aiguës dues à une augmentation de cellules immatures bloquées en différenciation. Ces LAM post-NMP sont de très mauvais pronostic avec une médiane de survie de 3 à 5 mois. Dans plus de la moitié des cas, la voie p53 est impliquée. TP53 est un facteur de transcription codant pour une protéine qui est activée en réponse à divers stress cellulaires, comme des lésions à l'ADN, et qui va permettre à la cellule d'arrêter de proliférer afin de pouvoir réparer les lésions ou d'entrer en mort cellulaire programmée. Les mutations de TP53 retrouvées dans les cancers inactivent ces fonctions de p53, ce qui entraîne une prolifération et une survie cellulaire non contrôlées. Il a été montré que ces mutations pouvaient également conférer de nouvelles fonctions à p53 mutée.

Dans ce projet, nous souhaitons identifier les mécanismes impliqués dans la transformation en leucémie des NMP.

Les leucémies aiguës myéloïdes post néoplasmes myéloprolifératifs sont des maladies complexes, et l'étude de ces cancers repose sur la mise en oeuvre en conditions physiologiques d'interactions complexes entre différentes cellules (dont des cellules immunitaires) et médiateurs (cytokines, etc). Etant donné l'implication de la voie p53 dans les LAM post NMP (retrouvée dans plus de la moitié des cas), un modèle *in vivo* est donc incontournable. Parallèlement, nous étudierons également des prélèvements primaires de patients atteints de LAM post NMP. De plus, comme le nombre de prélèvements de patients est limité du fait de la rareté de cette maladie, il est indispensable de développer des modèles murins. Ils nous permettront de valider et consolider les résultats obtenus chez l'homme. Par ailleurs, le processus de leucémogénèse requiert l'environnement médullaire impossible à reproduire *in vitro*. Enfin, la prolifération *in vitro* de cellules tumorales est limitée et ne reflète pas ce qui se passe *in vivo* chez l'homme. Notre modèle pourra éventuellement par la suite servir également de modèle préclinique si nous identifions de nouvelles cibles thérapeutiques.

Tout d'abord, nous devons étudier la coopération de p53 avec des gènes impliqués dans les NMP. Nous nous intéresserons aux 2 gènes les plus fréquemment mutés JAK2 et calréticuline (CALR), ces deux mutations résultent en une hyperactivation de la voie de signalisation JAK/STAT. Leur introduction chez la souris entraîne le développement d'un NMP. Les mutations de TP53 seront étudiées grâce à 3 lignées C57/BL6 différentes de souris 1/Trp53 KO afin d'étudier l'effet de la perte de fonction de p53, 2/Trp53 R172H et 3/Trp53 R270H, qui modélisent des mutations retrouvées dans les LAM post-NMP, afin d'étudier l'effet gain de fonction de ces mutants. Ces différents modèles sont inductibles et nous prévoyons d'induire KO ou le KI du gène d'intérêt à l'âge adulte dans les cellules hématopoïétiques. Nous étudierons l'effet de l'association de ces mutations chez la souris (CALR ou JAK2 + TP53) et verrons si les souris développent une maladie plus agressive, notamment une LAM. Si c'est le cas, elles pourront servir de modèles à l'étude des mécanismes pathologiques à l'origine du développement de la leucémie. Additionnement, nous validerons les cibles retrouvées dérégulées chez des patients atteints de LAM post NMP en les surexprimant ou en les inhibant dans un modèle murin de NMP JAK2V617F.

Afin de déterminer quelles sont les cellules souches responsables du développement de la maladie, nous réaliserons également des greffes de cellules humaines de patients atteints de LAM post NMP dans des souris immunodéficientes NSG et étudierons quelles populations de cellules sont amplifiées chez la souris, et quelles mutations sont retrouvées.

Enfin, nous testerons une drogue ciblant p53 muté dans ce dernier modèle.

Nous estimons à 2195 le nombre de souris nécessaires pour mener à bien nos projets (C57/BL6 et NSG). Le nombre d'animaux choisi pour chaque lot représente le minimum requis pour constituer un échantillonnage représentatif. Cette étude sera couplée à une étude utilisant des prélèvements de patients. Cependant, une étude *in vitro* n'est pas suffisante et a besoin d'être couplé à des études *in vivo*, afin de décrire précisément les fonctions des gènes TP53, CALR et JAK2 lors du développement de la LAM. L'accès aux prélèvements humains étant limité, et cette pathologie étant rare, l'étude de modèles murins est indispensable. Par ailleurs, la prolifération *in vitro* de cellules tumorales est très limitée et ne reflète pas ce qui se passe *in vivo* chez l'homme. De plus, l'utilisation de souris nous permettra d'obtenir dans un temps court un nombre satisfaisant d'animaux prêt à être expérimenté. Les greffes de cellules de patients nous permettront de déterminer quelles cellules sont responsables de la maladie (ce qui ne peut être confirmé que par cette méthode *in vivo*) et d'amplifier également le matériel humain, qui est limité. Enfin, l'étude de la drogue ciblant p53 nous permettra d'évaluer l'efficacité de ce traitement *in vivo*.

Les expérimentations seront menées sur des durées d'un an maximum, chez des souris adultes. Les points limite seront strictement appliqués. Toutes les interventions invasives (injections, prélèvements de sang) seront faites sous anesthésie à l'isoflurane. Les animaux bénéficieront d'un environnement enrichi en tout temps. Du DietGel Energy sera ajouté dans les cages en cas de diminution de la prise alimentaire. Les animaux seront suivis régulièrement et euthanasiés en cas de douleur.

14985 L'autisme aujourd'hui décrit comme un ensemble Troubles du Spectre Autistique (TSA) est une pathologie fréquente. Les principaux symptômes sont des déficits des interactions sociales et de la communication ainsi que des comportements, activités et intérêt restreint et stéréotypés. A la suite de certaines observations, une idée est apparue dans la littérature décrivant cette population comme moins sensible à la douleur que la population générale. Cependant, du fait des troubles de la communication et des interactions sociales ainsi qu'une déficience intellectuelle fréquente, les études évaluant la sensibilité douloureuse des patients TSA sont rares et non standardisées. Cependant, les patients atteints de TSA sont, au cours de leur vie, plus susceptibles d'expérimenter des situations douloureuses que la population générale. Pour cette raison, l'utilisation d'un modèle murin d'autisme permettrait la réalisation de mesures standardisées de la sensibilité douloureuse et de déterminer les mécanismes qui la sous-tendent permettant à plus long-terme d'améliorer la prise en charge et l'accompagnement des patients TSA mais aussi de leur s proches, des soignants et éducateurs. Le modèle envisagé est le modèle valproate (VPA). En effet, cette substance prescrite comme un anti-épileptique, lorsqu'administrée chez la femme enceinte multiplie le risque d'autisme de l'enfant par trois. Chez la souris, l'injection de cette substance lors de la gestation donne lieu à une portée de souriceaux présentant un comportement proche de la symptomatologie TSA (comportements répétitifs stéréotypés, troubles des interactions sociales) et est donc un modèle d'autisme bien admis dans la littérature. Nous entendons réaliser cette étude sur un total de 1110 souris (*mus musculus*) réparties sur 5 ans. Dans un premier temps, une approche comportementale permettra d'évaluer le niveau d'atteintes des souriceaux grâce à un suivi de leur développement moteur et sensoriel. Dans un deuxième temps, lorsque les sujets auront atteint l'âge adulte, nous évaluerons la sensibilité à la douleur en utilisant des tests déjà validés expérimentalement. Ce modèle d'autisme sera utilisé pour explorer les modifications fonctionnelles et cellulaires au sein des voies de la douleur au niveau de la moelle épinière et du cerveau. Notre projet s'inscrit dans le respect de la règle des 3Rs. Réduire nous entendons réduire le nombre d'animaux utilisés en réalisant notamment une étude comportementale longitudinale avec plusieurs points de mesures sur un animal. Raffiner les animaux seront hébergés dans des animaleries dont le fonctionnement est conçu pour maximiser le confort et limiter la souffrance des animaux. Les

souris seront hébergées en cohorte dans un environnement enrichi, elles feront l'objet d'observations régulières et de manipulation plurihebdomadaires, permettant une habituation aux manipulations et une réduction du stress. Pour chacune des procédures concernées, des points limites sont définis à l'aide de plusieurs paramètres dénotant la souffrance des souris. Remplacer nous privilégierons autant que possible les expériences *in vitro* ne nécessitant pas d'animaux supplémentaires. Dans cette optique nous espérons développer un modèle de culture cellulaire reproduisant au mieux les mécanismes cellulaires in-vivo de notre modèle autistique.

14986 Les troubles neuro-développementaux (TND), incluant des déficits de mémoire, d'apprentissage, de l'attention ou encore les troubles du spectre autistique, touchent plus de 10 % des enfants dans le monde et constituent un problème de santé publique majeur. Les polluants environnementaux sont aujourd'hui mis en cause dans l'apparition de ces troubles. Au cours de la grossesse puis de l'enfance, le cerveau est notamment exposé à de nombreux perturbateurs endocriniens (PE) dont certains augmentent le risque d'apparition de TND. Parmi les PE incriminés, le bisphénol A (BPA), un agent plastifiant aujourd'hui interdit dans les contenants alimentaires en France, est cependant encore retrouvé dans l'organisme chez l'enfant comme chez l'adulte. Ce composé contamine l'homme principalement par l'alimentation. Plusieurs études indiquent que le BPA pourrait être impliqué dans le développement de TND.

Dans le cerveau, les fibres nerveuses sont protégées par une gaine de myéline riche en lipides qui permet d'accélérer la transmission des messages nerveux. La myéline joue donc un rôle essentiel pour toutes les fonctions cérébrales. On sait que la formation de myéline, appelée myélinisation, est une étape cruciale du développement cérébral, dont la perturbation peut se traduire par l'apparition de TND. Cependant, très peu d'études se sont intéressées aux impacts des PE sur ce processus et notamment sur les lipides de la myéline.

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'impact d'une exposition précoce au BPA sur la myélinisation. Pour cela, des souris gestantes seront exposées au BPA par l'eau de boisson pendant la gestation et la lactation, depuis le 6^e jour de gestation jusqu'au jour post-natal 22 (P22), afin d'étudier les conséquences de cette exposition sur leurs descendants. Les effets du BPA décrits dans la littérature, qu'ils concernent le développement cérébral, la fonction cérébrale chez l'adulte ou d'autres fonctions de l'organisme, sont souvent différents chez les mâles et les femelles. Pour cette raison, le projet inclura l'analyse des animaux des deux sexes.

Pour toutes les observations envisagées, nous utiliserons 3 groupes d'animaux 1 groupe témoin (non exposé au BPA) et deux autres groupes exposés au BPA dilué dans l'eau à des dosages différents.

L'un des objectifs principaux consiste à analyser, chez les descendants des femelles exposées, la composition lipidique de différentes régions cérébrales (cortex, hippocampe, cervelet) à un stade précoce (P15 début de myélinisation) et un stade tardif (P40 cerveau myélinisé). En effet, alors que la myéline est majoritairement composée de lipides (70%), ces derniers ne sont presque jamais explorés dans les études s'intéressant aux conséquences de l'exposition du cerveau en développement à une substance potentiellement toxique. Nous rechercherons des modifications de la composition lipidique cérébrale induites par le BPA. Des analyses complémentaires seront également réalisées à différents stades entre la naissance et P40, incluant l'analyse de l'expression de protéines et de gènes. Pour ces analyses, les cerveaux seront prélevés sur animaux euthanasiés à différents temps.

De plus, nous réaliserons des analyses comportementales à différents stades afin de corrélérer les modifications moléculaires induites par le BPA à des modifications fonctionnelles. Nous évaluerons notamment les capacités de communication chez les souriceaux âgés d'une semaine, les interactions sociales chez les souris de 3 semaines et les capacités de mémorisation chez les souris de 5 semaines.

En tenant compte du nombre minimum d'animaux nécessaires pour garantir une puissance statistique suffisante pour chaque type d'expérience, nous avons calculé que ce projet nécessiterait

l'exposition de 150 femelles gestantes, qui donneront naissance à 1350 descendants des deux sexes, soit un total de 1500 animaux utilisés. La durée prévue pour cette étude est de 5 ans.

Cette étude prendra en compte la réglementation des 3R

Remplacement La myélinisation est un processus développemental long et complexe impliquant de nombreuses interactions cellulaires entre les différents types cellulaires cérébraux. Pour cette raison, son étude ne peut être envisagée « *in vivo* ». En outre, un modèle animal exposé par voie orale est actuellement le seul moyen pertinent de mimer l'exposition humaine au BPA.

Réduction Le nombre d'animaux estimé et les tests statistiques utilisés sont basés sur notre expérience pour les différentes analyses et nous permettra de répondre aux questions scientifiques de ce projet. En particulier, l'analyse ciblée des lipides de la myéline sera réalisée sur une sélection de lipides, dont l'analyse statistique nécessite deux fois moins d'animaux par groupe pour mettre en évidence des différences significatives qu'une analyse non ciblée de tous les lipides. De plus, différentes régions cérébrales seront prélevées pour chaque animal. Les différents tests comportementaux seront réalisés successivement sur les mêmes animaux, qui seront également utilisés après le dernier test pour réaliser les autres analyses prévues dans ce projet à P40 (lipides, analyses complémentaires).

Raffinement Les animaux seront hébergés en groupes et en milieu enrichi pour minimiser leur stress. La procédure d'exposition des animaux par l'eau de boisson, non invasive, ne générera pas de stress ou de souffrance. Une surveillance hebdomadaire sera mise en œuvre incluant l'observation de l'apparence, de signes cliniques et du comportement des animaux. Un score sera établi à l'aide de grilles adaptées (annexes 1 à 4) pour lesquelles des points limites ont été définis. S'ils sont atteints, nous procéderons au renforcement de la surveillance ou à la mise à mort de l'animal (pour un score défini comme point limite terminal). Pour réaliser les tests comportementaux, nous mettrons en œuvre des procédures définies visant à minimiser le stress des animaux et à assurer la qualité et l'exploitabilité des résultats. A la fin de l'étude, les animaux seront mis à mort selon les méthodes réglementaires.

14987 Les maladies associées au développement de l'œil, notamment d'une région appelée la rétine, mènent à la perte progressive de la vue chez l'enfant et l'adolescent. Principalement d'origine génétique, le gène *Abca4* en est un candidat majeur. Les travaux précédents suggèrent que l'absence d'*ABCA4* entraîne une perte de cellules particulières qui captent la lumière, appelées les cônes. Ces derniers sont générés très tôt au cours du développement. Les souffrances occasionnées aux patients ainsi que les coûts médicaux générés ont fait de la santé visuelle un enjeu crucial de la société. Bien que de nombreux modèles animaux (rats, souris transgéniques ou non) soient disponibles, les connaissances actuelles et la compréhension de la physiopathologie de la rétine restent incomplètes et controversées.

L'objectif de ce projet est de mieux comprendre le rôle du gène *Abca4* dans la génération des cônes au cours du développement de la rétine, ainsi que les mécanismes entraînant le déficit visuel liée à cette mutation. Pour étudier le rôle de ce gène pendant le développement de la rétine, une forme mutée non pathogène de ce gène est injecté dans l'œil d'embryons de rongeurs en intervenant sur des femelles gestantes sous anesthésie générale. Les conséquences cellulaires de cette mutation sur le développement de la rétine seront alors étudiées chez les embryons et les nouveau-nés.

Pour ce projet d'une durée de 5 ans, le nombre maximal de souris et rattes des sables gestantes envisagé est 15 et 70 femelles gestantes soit au maximum 150 et 525 embryons respectivement. Néanmoins, dans le respect de la règle des « 3R (remplacer, réduire, raffiner) », le nombre d'animaux sera diminué au maximum en restant dans la limite de significativité statistique (c'est-à-dire au moins 3 embryons pour chaque analyse).

Remplacement : L'utilisation de modèles animaux (rongeurs) est indispensable pour étudier le développement de la rétine, car aucun modèle d'expérimentation *in vitro* ne peut mimer ou refléter toute la complexité des phénomènes ayant lieu dans la rétine en développement.

Réduction : Le modèle rongeur Rat des sables est parfaitement adapté, car chez le Rat des sables, la rétine est très enrichie en cônes (15 fois plus que les souris). Toutefois, ce modèle reste encore

mal connu du point de vue du développement de la rétine et de son mode de développement, contrairement à la souris. C'est pourquoi, une première approche sera réalisée chez la souris. Les résultats obtenus avec la souris seront ensuite transposés au modèle de ratte des sables. Pour minimiser le nombre d'animaux, la forme mutée non pathogène du gène a été précédemment validés sur des souris au stade de développement postnatal. Egalement, la mise en place de la technique chez la souris permettra d'augmenter les performances de l'expérimentateur jusqu'à l'acquisition de gestes automatiques associés à un pourcentage de réussite approchant les 75%, ce qui permettra ensuite de diminuer le nombre de rattes utilisé ultérieurement dans le projet.

Raffinement : La plus grande attention sera portée au bien-être des animaux. L'élevage et la reproduction des animaux se font dans un environnement contrôlé permettant une réduction du stress pour l'animal. Pour cela, les animaux sont maintenus en groupe de deux dans un environnement contrôlé en température et hygrométrie, et enrichi avec des éléments à ronger et pour construire le nid. L'intervention dure au maximum 45 minutes, pendant laquelle la femelle gestante sont manipulée sous anesthésiée générale, qui est complétement d'un anesthésique local, et sur coussin chauffant. Un traitement contre la douleur est également administré pendant l'intervention et poursuivi pendant les trois jours suivants. L'animal est maintenu sur coussin chauffant jusqu'au réveil dans sa cage. Ensuite, il est surveillé toutes les deux ou trois heures le jour de l'intervention, puis deux fois par jour les jours suivants afin de prévenir toute douleur ou détresse. Si d'éventuelles infections post-chirurgicales ou autres complications sont détectés, l'animal sera soustrait du projet limitant ainsi la souffrance et le stress.

14988 La dépression est la pathologie mentale la plus fréquente. Elle nécessite une prise en charge très longue et sera, en 2030, au plan mondial, une des pathologies les plus importantes en termes de santé et société. En plus du stress chronique, la douleur chronique est un facteur déterminant dans son apparition puisque la co-morbidité douleur chronique/dépression atteint 50%. Nous faisons l'hypothèse que des modifications de la neuroplasticité du cortex cingulaire antérieur (CCA), sous-tendent la dépression induite par la douleur chronique.

Nous proposons une étude comportementale et génomique pour étudier les rôles des neurones glutamatergique et GABAergique du CCA dans la dépression. Le projet nécessitera 900 souris et sera conduit en respectant la règle des 3R visant à remplacer ou réduire chaque fois que possible le nombre d'animaux ainsi qu'à optimiser les procédures.

Remplacer Au vu de notre thématique d'étude, il nous est malheureusement impossible de remplacer notre modèle *in vivo* par un modèle *in vitro* ou *in silico*. En effet, la caractérisation de la douleur et de sa composante émotionnelle et affective nécessite une observation comportementale, uniquement possible chez l'animal vivant et vigile.

Réduire les expériences seront cependant réalisées avec la volonté de réduire autant que faire se peut le nombre d'animaux par condition expérimentale, mais toujours dans l'optique d'obtenir le maximum d'information scientifique par test. Ainsi, au regard des données de la littérature et de la variabilité phénotypique individuelle, les groupes expérimentaux explorant les comportements de type anxio-dépressif liés aux douleurs chroniques seront constitués de 20 souris. Toujours dans l'idée de diminuer au maximum le nombre d'animaux utilisés certaines des 6 procédures expérimentales détaillées ci-après feront partie d'un enchainement et utiliseront les mêmes animaux, ce qui en réduira grandement l'effectif. Pour cette raison une même cohorte d'animaux sera étudiée et caractérisée au niveau comportemental et émotionnel, puis fera l'objet d'investigations moléculaires.

Raffiner Les animaux sont hébergés en animalerie dont la température, l'humidité et le cycle jour/nuit sont contrôlés, nourriture et boisson sont disponibles ad libitum. Ils seront hébergés en cohorte de 4 ou 5 individus pour respecter leurs besoins sociaux. Des carrés de coton seront placés dans la cage pour favoriser la nidation, et des barreaux de bois à ronger pour limiter les comportements d'agressivité. Nous travaillerons en cycle jour/nuit inversé (lumière allumée de 21h à 9h), pour éviter les manipulations durant le temps de sommeil des animaux et ainsi diminuer le stress. Les animaux seront observés tous les jours et leur comportement sera suivi afin de déceler tout signe d'inconfort ou de stress. Durant les chirurgies des méthodes d'anesthésie et d'analgésie

sont systématiquement utilisées. Les signes de mal-être suivants seront recherchés : perte de poids, blessure ou plaie ouverte, dégradation de l'état du pelage, dos arqué. Un exemplaire du mouse grimace scale sera disponible (annexe 1) pour aider à la détection des signes de douleurs aiguës. En cas de signes de souffrance de l'animal, des soins (désinfection, suture de plaie), une administration d'antalgique ou d'anti-inflammatoire, une séparation (blessures entre congénères) seront réalisés après concertation avec le vétérinaire, la Structure chargée du Bien-Etre des Animaux (SBEA) et/ou le personnel zootechnique de l'institut. Enfin, des points limites sont mis en place pour l'ensemble des procédures expérimentales. Si de nouvelles approches moins stressantes ou douloureuses pour l'animal venaient à être mises au point après le début de ce projet, une concertation avec la SBEA de l'institut pourra être réalisée afin d'intégrer ces nouvelles pratiques dans nos procédures.

14989 Détecter précocement les phases de décompensation de l'insuffisance cardiaque est un enjeu de santé publique majeur. Nous proposons une approche originale qui consiste à implanter par voie endoscopique, dans la zone de la paroi gastrique, le plus proche possible du cœur, un dispositif miniaturisé capable de recueillir des grandeurs physiques caractérisant l'activité cardiorespiratoire, et de les transmettre à une station de recueil capable de les interpréter. Ce dispositif est destiné, à terme, à anticiper chez des patients insuffisants cardiaques, les phases aiguës de décompensation pour permettre aux cliniciens d'adapter très rapidement leurs conduites thérapeutiques.

Un premier prototype analogique filaire implanté chirurgicalement par gastrostomie a apporté la preuve de concept et démontré notre capacité à détecter les signaux d'intérêt dans des conditions optimales d'acquisition (animal anesthésié). Suite à ces résultats préliminaires, un nouveau dispositif numérique a été développé, intégrant la possibilité de transmettre sans fil les paramètres recueillis, permettant ainsi l'acquisition de données sur plusieurs jours en conditions ambulatoires.

L'objectif principal de cette nouvelle étude est de mettre au point et de valider un protocole de pose et un protocole de retrait de notre dispositif par voie endoscopique, sur un modèle animal. Cette étude permettra également d'évaluer la stabilité *in vivo* du dispositif et la réponse de l'hôte à la présence de l'implant dans la zone sous-muqueuse de la paroi gastrique sur une période de 2 semaines post-implantation.

L'étude sera réalisée sur des porcs (*Sus scrofa domesticus*), en raison des nombreuses similitudes anatomo-physiologiques avec l'homme. Un maximum de 10 animaux sera utilisé pour couvrir l'ensemble des objectifs du projet. Ce nombre a été réduit au minimum afin de respecter la règle des 3 R sans que cela puisse compromettre la mise au point de la procédure chirurgicale et les conclusions du projet sur la stabilité de l'implant. Il n'existe pas d'alternative à l'expérimentation animale pour développer et valider ce type de dispositif destiné à la mesure de paramètres physiologiques *in vivo*. Le remplacement n'est donc pas possible. Les équipes impliquées dans le projet sont constituées de spécialistes des approches *in vivo* chez l'animal, ce qui assure des pratiques expérimentales maîtrisées, ainsi qu'un soin et un hébergement des animaux dans des conditions optimales. Médecins, vétérinaires et animaliers associeront leurs expertises pour assurer la meilleure prise en charge des animaux lors de l'intervention et après l'intervention en utilisant des médicaments analgésiques et une alimentation adaptée pour limiter les éventuelles douleurs gastriques induite par la pose de l'implant. Enfin, une quantification précise de la prise alimentaire associée au suivi quotidien des animaux dans les jours suivant l'intervention constituera un bon indice de l'acceptabilité du dispositif dans la paroi gastrique et de la cicatrisation de la zone d'introduction. Le protocole est modéré et ne devrait pas induire de souffrance excessive. Toutefois en cas de complication imprévue et de souffrance de l'animal qui ne régresserait pas avec les traitements antalgiques les animaux seront euthanasiés. Les animaux avant l'opération sont régulièrement manipulés, caressés et grattés afin de faciliter le contact avec l'homme et les soins postopératoire. Leur milieu est également enrichi avec des jouets dans l'objectif de favoriser le bien-être de ces animaux. Il en est de même après l'intervention chirurgicale.

14990 *Clostridium difficile* (*C. difficile*) est une bactérie première cause de diarrhée nosocomiale chez l'adulte dans les pays développés et en particulier en France (> 24000 cas par an, dont 14 % de

formes compliquées, la plus connue étant la colite pseudomembraneuse, associée à 3% de mortalité). Les infections à *C. difficile* représentent un coût sanitaire important, en raison de l'augmentation des durées moyennes de séjours et du surcoût des soins associés. Malgré des traitements antibiotiques efficaces, les récurrences des infections à *C. difficile* sont fréquentes (environ 20%) et des résistances aux antibiotiques apparaissent. Les récurrences pourraient être liées à la persistance des spores dans l'intestin mais pourraient également être liées à la persistance de la bactérie dans sa niche colique sous forme de biofilm. Au sein de ce biofilm, les bactéries sont enrobées dans une matrice et attachées à la muqueuse. Cette configuration leur permet de survivre en conditions hostiles et engendrent des résistances à la réponse immunitaire de l'hôte et aux antibiotiques. *C. difficile* est capable de former un biofilm *in vitro* mais la formation de biofilms est dépendante de la nature du support sur lequel le biofilm est formé. Or il n'existe à ce jour aucun modèle *in vitro* ou *in silico* permettant de reproduire la formation du biofilm *in vivo* d'où la nécessité d'avoir recours au modèle animal.

Nos premiers résultats obtenus *in vivo* dans un modèle de souris monoxénique (souris axéniques (sans germe) infectées par une souche bactérienne) ont montré que pour une souche de *C. difficile*, les bactéries tapissant la muqueuse sont majoritairement retrouvées à l'extérieur de la couche de mucus et sont organisées sous forme de structure en 3 dimensions suggérant la formation d'un biofilm (protocole CAPSUD autorisé 2012-109). Nous souhaitons poursuivre cette étude sur un panel plus important de souches afin de déterminer la nature des interactions des bactéries avec la muqueuse intestinale et d'étudier la composition de l'éventuel biofilm. Le modèle de souris monoxénique présente l'avantage d'être un modèle simple permettant d'observer aisément les structures des éventuels biofilms. C'est de plus un modèle de colonisation puisqu'avec la majorité des souches testées, les souris monoxéniques ne développent pas de signes cliniques. Toutefois l'environnement du tractus intestinal dans un modèle de souris monoxénique étant différent de celui dans un modèle de souris à microbiote complexe, le recours à un modèle de souris ayant un microbiote installé dans le tractus digestif sera réalisé dans un second temps et fera l'objet d'un nouveau protocole. Dans ce projet, plusieurs paramètres seront mesurés la colonisation de ces bactéries au niveau du tractus digestif, la distribution des bactéries au niveau du tractus digestif et le type d'interaction des bactéries avec la muqueuse intestinale ainsi que la composition de la matrice du biofilm formé.

L'exigence de réduction, raffinement, et remplacement des animaux sera respectée

Remplacement Les caractéristiques du biofilm bactérien dépendent en partie du support sur lequel il se développe. Aussi le recours à l'animal est indispensable pour étudier le rôle du biofilm dans le processus infectieux.

Réduction une planification statistique minutieuse a permis de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en préservant la validité statistique de l'étude afin d'avoir une puissance statistique suffisante pour observer un effet. Les groupes contrôles des animaux ont été mutualisés aussi souvent que possible. Au total, un nombre maximal de 150 souris sera nécessaire pour la procédure de cette étude.

Par ailleurs, seules les souches testées en amont *in vitro* pour leur capacité à former des biofilms, seront testées en modèle animal.

Raffinement les animaux seront surveillés quotidiennement et leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer qu'ils subissent le minimum de stress possible. Les animaux auront un accès direct et illimité à l'eau de boisson et à la nourriture.

14991 La lipolyse du lait correspond à une dégradation enzymatique de la matière grasse du lait par des enzymes appelées lipases et conduit à l'accumulation d'acides gras libres (AGL) dans le lait. L'accumulation dans le lait et les produits laitiers des AGL issus de cette dégradation provoque l'apparition de goûts rance et de savon. Des mécanismes peuvent aggraver ce phénomène.

Une lipolyse induite peut survenir lors de la traite ou de la fabrication des produits laitiers à la suite de chocs mécaniques ou thermiques du lait qui endommagent les globules gras du lait et permettent aux lipases d'avoir ainsi un accès plus facilité aux triglycérides qu'elles hydrolysent en libérant des

acides gras. Il existe également une lipolyse spontanée résultant d'une interaction complexe entre pratiques d'élevage, physiologie et génétique des animaux. La lipolyse spontanée du lait de vache est assez bien documentée, mais les mécanismes fins de sa régulation sont mal connus. En brebis, la lipolyse a été très peu étudiée et les facteurs l'affectant et les mécanismes biochimiques sous-jacents ne sont pas connus.

L'objectif de cet essai est d'étudier chez la brebis Lacaune l'effet d'une restriction alimentaire modérée (alimentation couvrant 65% des besoins en énergie et protéines) sur la lipolyse du lait selon la susceptibilité initiale des brebis à la lipolyse.

A travers ce projet nous cherchons à répondre en ovins laitiers aux questions suivantes :

- Quels sont les mécanismes biochimiques qui contrôlent et régulent la lipolyse spontanée ?
- En fonction des taux de lipolyse initiaux quel est l'effet d'une restriction alimentaire modérée sur la lipolyse spontanée ?

Pour répondre à ces questions, 48 brebis laitières de race Lacaune seront suivies sur une durée de 3 semaines dont une semaine de restriction alimentaire. Ces brebis seront caractérisées sur des critères de composition du lait dont la lipolyse (par des prélèvements de lait hebdomadaires, réalisés à partir du lait recueilli lors de la traite), de métabolisme énergétique (par des dosages sanguins hebdomadaires), d'état d'engraissement (par des mesures hebdomadaires ou bihebdomadaires) et d'ingestion (par des mesures journalières).

Nous veillerons au respect de la règle des 3R remplacer, réduire, raffiner.

Remplacer nous souhaitons étudier chez la brebis Lacaune la lipolyse spontanée du lait, ceci ne peut être évalué que sur des animaux vivants et en lactation.

Réduire le nombre d'animaux correspond au nombre minimum nécessaire calculé pour mettre en évidence une différence raisonnable de lipolyse entre les 2 niveaux d'alimentation.

Raffiner les brebis seront hébergées en lot dans un environnement adapté à leurs besoins sur une litière paillée, et sur copeaux lors de la restriction alimentaire. La restriction alimentaire sera limitée à une semaine. Sa durée et son niveau correspondent à des situations observables en ferme lorsque les fourrages sont de mauvaises qualité ou que leur quantité est transitoirement insuffisante en raison de stocks limités. Les brebis feront l'objet d'une surveillance chaque jour à plusieurs reprises pendant toute la durée du protocole, notamment lors des 2 distributions d'aliments et les 2 traites quotidiennes.

Les prélèvements de sang seront limités à 3 prises de sang pour la totalité du protocole, avec à chaque fois un volume sanguin prélevé inférieur à 1% du volume sanguin total. Pour réduire la douleur lors de la prise de sang et limiter l'angoisse des animaux, les brebis sont entraînées à coopérer. Ainsi un travail au préalable d'habituation au couloir de circulation et à la contention est réalisé. La contention et la prise de sang sont faites par des personnes habilitées, que les brebis connaissent. Si un des points limites est observé sur une brebis baisse de l'ingestion (plus de 50%), perte de poids de plus de 10% entre 2 pesées, réticente au déplacement, incapacité à se déplacer, interactions sociales altérées (brebis à l'écart), elle sera retirée du protocole, soignée par le vétérinaire praticien et retrouvera des conditions classiques d'élevage.

14992 L'utilisation de l'enclos extérieur (dénommé parcours) par les poulets élevés en plein air est très variable et souvent faible. La personnalité de l'animal (définie par l'existence de différences individuelles dans l'expression de comportements, stables au cours du temps et/ou dans différents contextes) pourrait partiellement expliquer l'utilisation ou la non-utilisation de ce parcours. De plus il est connu que les différents profils de personnalité ont un impact sur les capacités cognitives (mémoire et apprentissage, par exemple) des individus et par conséquent sur la manière dont les individus vont interagir avec leur environnement.

Notre projet vise donc à caractériser davantage, au niveau comportemental et cognitif, les différences existantes au sein d'un lot de poulets plein-air. 120 poulets seront utilisés dans le cadre des procédures expérimentales décrites plus loin. En particulier, nous examinerons le lien entre utilisation du parcours, personnalité et différents processus cognitifs (mémoire, apprentissage,

inhibition comportementale, persistance). Il convient donc d'observer en condition d'élevage, sur le parcours, les poulets dans leur groupe social, pour, dans un premier moment, quantifier l'utilisation du parcours. Afin de suivre les individus tout au long de leur vie, il est nécessaire que l'observateur puisse les identifier. Ainsi nous utiliserons des « ponchos » (voir procédure 1), une méthode d'identification non invasive mais pouvant occasionner des blessures ou un stress aux animaux, ou encore des modifications du comportement (démarche anormale, prostration).

Par ailleurs, nous souhaitons réaliser des tests individuels permettant de vérifier le lien entre l'utilisation du parcours, la personnalité et la cognition. Ces tests impliquent une période de privation alimentaire et d'isolement des poulets de leurs congénères (voir procédure 2).

Remplacement Le recours aux animaux vivants dans les études de comportement animal reste nécessaire, afin d'avoir une vision sur la complexité des réponses des individus face aux contraintes environnementales et sociales auxquelles ils sont soumis. Il est également important de se placer en condition d'élevage pour pouvoir suivre le comportement naturel d'exploration des animaux sur le parcours extérieur.

Réduction Un lot de 120 poulets mâles sera soumis aux deux procédures. Afin de limiter le nombre de facteurs et conséquemment le nombre d'animaux nécessaires pour les tests statistiques, nos expériences seront réalisées uniquement sur des poulets mâles. La taille du groupe doit permettre d'approcher la densité réglementaire d'un élevage plein air et permettre l'identification des individus avec des comportements explorateurs extrêmes (les plus et les moins explorateurs). Le design expérimental et les statistiques utilisés (analyse en composantes principales, modèles linéaires, ANOVA) sont en accord avec la littérature existante pour l'étude de la personnalité et cognition animale et nous permettra de tester un grand nombre d'individus tout en simulant ce qui pourrait se passer dans un élevage traditionnel.

Raffinement Des stratégies de raffinement ont été mises en place pendant tout le processus expérimental. Les conditions d'élevage des animaux se rapprochent de celles d'un élevage avicole biologique classique conformément à la réglementation. Les animaux seront hébergés dans des conditions optimales d'alimentation et de soins, avec un suivi quotidien afin d'assurer leur bien-être. Des points limites ont été déterminés et une surveillance au minimum quotidienne des animaux est assurée afin de détecter précocement toute altération de leur état de santé ou de leur comportement.

14993 Après éclosion au large, de nombreuses espèces de poissons marins rejoignent en fin de développement larvaire les nurseries côtières. Les conditions trophiques et plus globalement la qualité des eaux de ces écosystèmes côtiers sont essentiels pour la croissance et la survie des poissons très sensibles aux jeunes stades de vie. Les zones de nurserie sont susceptibles d'être sélectionnées par les organismes en fonction de leurs besoins (par exemple en nourriture). La capacité des larves et des juvéniles à localiser des nurseries adaptées à leurs besoins peut donc être essentielle à leur survie. Cette capacité dépend en grande partie de leurs systèmes sensoriels. Si les données de la littérature indiquent des effets à court terme de l'acidification des océans sur les systèmes sensoriels du poisson aux jeunes stades de vie (stades larvaires et juvéniles), les capacités adaptatives des poissons sur le long terme, et notamment à l'échelle transgénérationnelle, sont encore inconnues. Ces informations sont pourtant nécessaires afin de mieux évaluer les conséquences écologiques de l'acidification, qui peut être associée au réchauffement des océans, sur la dynamique des populations de poissons. Dans le cadre de ce projet, nous proposons de mieux caractériser (i) la réaction comportementale des jeunes (larves, juvéniles) bars européens (*Dicentrarchus labrax*) vis-à-vis de conditions trophiques ou de la qualité de l'eau et (ii) l'effet du pH et du réchauffement des océans sur les systèmes sensoriels et les capacités cognitives (d'apprentissage) susceptibles d'impacter cette réaction. Cette étude va être réalisée via la mise en oeuvre d'approches fonctionnelles (tests comportementaux) et mécanistiques (étude moléculaire d'acteurs impliqués dans les capacités sensorielles et cognitives). Ces études seront réalisées chez des larves et juvéniles issus de géniteurs élevés depuis 5 ans à deux pH différents (pH 8 : condition de pH actuel des océans; pH7.6 : condition de pH des océans prédite pour 2100). Les pontes de 8 poissons géniteurs femelles seront induites par traitement

hormonal. 40 mâles pourront féconder ces oeufs. Les géniteurs mâles et femelles seront maintenus en vie à l'issue de la reproduction. Le nombre de géniteurs mâles et femelles choisi est nécessaire pour obtenir une nouvelle génération comprenant une diversité génétique suffisante à partir de laquelle des expérimentations seront réalisées sur 1080 poissons aux stades larvaires (20 et 45 jours post éclosions correspondant à des stades "pré" et "post" métamorphose) et 630 au stade juvénile (100 jours post éclosions). 1758 animaux, tout âge confondu, seront donc nécessaires au total. Les tests comportementaux aux stades larvaires et juvéniles consisteront à analyser la réaction comportementale des poissons placés dans des environnements où seront appliqués des stimuli sensoriels olfactifs (odeurs de proies ou de prédateur) ou visuels (vue d'un prédateur). Les capacités "d'apprentissage" seront également évaluées en étudiant la réaction des poissons placés à intervalle de temps dans des environnements stimulants similaires. Nous chercherons à déterminer les effets éventuels d'une diminution du pH de l'eau associée ou pas à une augmentation de la température sur ces comportements.

Le projet s'inscrit dans le respect de la règle éthique des 3R

Remplacer : Le remplacement du modèle animal n'est pas possible dans ce projet car il n'existe pas d'alternative expérimentale permettant d'étudier le comportement des poissons en interaction avec leur environnement.

Réduire : Le nombre d'animaux utilisés pour l'expérimentation est réduit raisonnablement pour permettre des analyses statistiques fiables malgré la variabilité de la réponse comportementale entre les individus.

Raffiner : L'élevage des poissons est réalisé par du personnel compétent dans des conditions zootechniques optimales pour l'espèce. Toutes les manipulations sont expressément conçues dans le but de réduire au maximum le stress des animaux afin de garantir leur bien-être. Les approches comportementales consistent en des procédures légères. L'expérimentation et les prélèvements (post mortem) seront réalisés par du personnel formé et habilité dans le plus total respect des règles d'hygiène, de sécurité et d'éthique.

14994 La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est la plus fréquente des maladies musculaires (1/3500 naissances mâles). Elle est causée par un défaut dans le gène de la dystrophine (gène DMD), situé sur le chromosome X et résulte d'une dégénérescence progressive du tissu musculaire. La maladie touche tous les muscles de l'organisme, y compris le muscle cardiaque et le diaphragme. Chez les patients DMD, la marche est définitivement perdue avant l'âge de 15 ans et le décès survient généralement avant 30 ans. Il n'existe pas de traitement curatif pour la DMD à ce jour. La thérapie génique fait partie des approches envisageables pour le traitement de cette pathologie chez l'homme ou pour le maintien ou l'amélioration de la fonction musculaire. En particulier, la vectorisation d'un transgène thérapeutique grâce à un vecteur adéno-associé recombinant (AAVr) est une approche très prometteuse puisque ces vecteurs permettent un transfert de gène efficace des muscles squelettiques et cardiaques. Cependant, le transfert du gène de la Dystrophine n'est pas envisageable car celui-ci dépasse largement la capacité d'encapsulation des vecteurs AAVr.

Une stratégie thérapeutique alternative consiste à corriger la mutation DMD via une technique appelée « saut d'exon ». Cette stratégie est médiée par des oligonucléotides antisens (AON) spécifiques du gène DMD, qui peuvent être transportées dans le muscle via des AAVr. Elle permet la génération d'une protéine délétée au sein de sa structure interne mais quand même fonctionnelle, à l'image de la protéine dystrophine que l'on retrouve dans la dystrophie musculaire de Becker moins sévère que la DMD.

En raison de la variation génétique existante entre espèces, la possibilité d'utilisation de modèles murins présentant des mutations dans le gène DMD murin est limitée pour tester et optimiser les AON spécifiques à l'homme *in vivo*. Pour résoudre ce problème, une équipe de recherche a récemment généré la souris mdx/hDMDdel52. Ce modèle porte à la fois les gènes de la DMD murine et humaine. Cependant, dans ce modèle, l'expression de la dystrophine murine est supprimée en raison d'une mutation "stop" au niveau de l'exon 23 du gène DMD murin, tandis que

l'expression de la dystrophine humaine est abolie en raison de la suppression de l'exon 52 dans le gène DMD humain. Le modèle mdx/hDMDdel52 se révèle être pertinent pour évaluer l'efficacité thérapeutique d'AON spécifiques du gène DMD humain, et pouvant le corriger soit par saut de l'exon 51, soit par saut de l'exon 53. Comme la souris mdx, ce modèle montre des signes de dystrophie musculaire au niveau histologique et une déficience fonctionnelle au niveau phénotypique.

Notre projet vise donc à évaluer l'efficacité thérapeutique de plusieurs produits AAVr-AON pour la correction du gène DMD humain dans le modèle mdx/hDMDdel52.

Dans ce projet s'étalant sur 5 ans, nous inclurons un maximum de 830 souris mdx/hDMDdel52 avec un nombre de 4 à 10 animaux par groupe expérimental, selon les objectifs poursuivis.

L'application de la règle des 3R au cours de ce projet sera effectuée comme suit

- Réduction : Le nombre d'animaux inclus sera de maximum 10 souris par groupe. Ce nombre est basé sur notre expérience précédente de protocoles de thérapie génique chez le rongeur lors desquels nous avons pu obtenir des résultats cohérents et reproductibles dans des groupes de cette taille. Cela semble être un nombre minimal qui permette d'assurer la robustesse des résultats sans qu'il soit excessif en terme d'animaux à inclure. Selon les résultats, la totalité des souris ne sera peut-être pas utilisée dans chaque groupe (<10 souris par groupe), et pouvant participer ainsi à la REDUCTION. Une analyse statistique sera réalisée, en utilisant des tests non paramétriques de type Kruskal-Wallis.

- Raffinement : 1) de bonnes conditions d'hébergement selon la réglementation en vigueur avec un enrichissement du milieu (cages équipées de mezzanine et mise à disposition d'éléments d'enrichissement comme des carrés de coton, des tunnels en carton, des sizzle dry (papier) et des morceaux de bois).

2) un suivi régulier des animaux (observations biquotidiennes, pesées régulières, analyse du comportement)

3) l'instauration de points limites pertinents et la mise en place de mesures adaptées si nécessaire (anesthésies, traitements analgésiques ou autre, ou euthanasie si pas d'autre alternative)

4) Afin d'améliorer la réactivité du personnel animalier, une grille de scoring de la douleur sera mise en place dès que celle-ci s'avère nécessaire afin de pouvoir détecter précocement tout point limite et mettre en place les actions adéquates (cf. exemple annexe de la saisine).

5) la mise en place de mesures adaptées en fonction des interventions éventuelles (anesthésie et analgésie si nécessaire).

- Remplacement le remplacement d'animaux ne sera pas possible dans cette étude, car il n'existe pas aujourd'hui de méthode alternative pour tester l'effet d'un traitement de thérapie génique *in vivo*. L'animal est le seul organisme vivant permettant d'étudier l'impact d'un transfert de gène dans différents types cellulaires (différents organes) et sur son phénotype, en lien avec le produit testé, le mode d'administration utilisé et la dose.

14995 La leucémie aiguë promyélocytaire est un cancer des cellules de la moelle osseuse et du sang, déclenché par une anomalie génétique qui conduit à la production d'une protéine anormale, qui est nécessaire et suffisante pour déclencher la leucémie. En utilisant des approches pharmacologiques et génétiques, nous avons formellement démontré que la dégradation de cette protéine est responsable de l'éradication définitive de la maladie par la combinaison de deux agents thérapeutiques. Nous cherchons maintenant à caractériser les événements en amont et en aval de cette dégradation. Il a été montré qu'une protéine connue pour induire la mort cellulaire joue un rôle dans l'effet bénéfique du traitement dans la leucémie aiguë promyélocytaire. Ainsi, nous nous attacherons à caractériser ce rôle en étudiant l'activation de cette protéine dans des modèles murins en utilisant sa forme naturelle ou bien modifiée affectant son activité. Les études *in vivo*, en se rapprochant des situations observées chez les patients, nous permettront de mieux comprendre les voies d'actions de ces médicaments, ce qui demeure indispensable pour améliorer les conditions thérapeutiques.

Les animaux utilisés seront des souris qui modéliseront la leucémie aiguë promyélocytaire par injection intraveineuse de cellules leucémiques de moelle osseuse (injection dans la veine de la queue sur souris éveillées). Après estimation du développement de la leucémie par palpation de la rate (splénomégalie), les souris seront traitées ou non par différents agents thérapeutiques, administrés soit par injections intra-péritonéales quotidiennes (sur souris éveillées), soit par implantation d'une capsule-médicament à libération programmée sur 21 jours directement sous la peau en une seule intervention (chirurgie réalisée sous anesthésie générale). En fonction des différents buts expérimentaux, les animaux seront donc traités de 3h à 21 jours et seront suivis quotidiennement durant toute la durée de l'expérience.

Ce projet de recherche s'inscrit dans le respect de la règle des 3 R. En effet, nous avons réalisé le maximum de tests *in vitro*. Cependant le recours à un modèle animal est maintenant nécessaire afin d'analyser le processus complexe de progression tumorale dans un système physiologique qui tient compte de l'environnement dans lequel ces cellules se développent. Par ailleurs, nos cohortes d'animaux seront réduites au minimum après estimation des effectifs basée sur les données antérieures du laboratoire et une simulation statistique afin de garantir l'obtention de résultats statistiquement recevables. Nous utiliserons au maximum 744 souris sur les 5 ans que durera le projet, réparties en un groupe contrôle (absence de la protéine impliquée dans la mort cellulaire) et 5 groupes test (protéine naturelle ou modifiée).

Les animaux seront hébergés en groupes pour respecter leur comportement grégaire. Nous aurons recours à l'anesthésie/analgésie pour implantation en sous-cutanée. Une grille d'évaluation de leur comportement sera tenue et différents critères seront scorés quotidiennement de façon à définir des points limites de douleur/souffrance précoces. En cas de détection de modifications de comportement pouvant être associées à une douleur, un analgésique sera donné et si aucune amélioration n'est observée en 24h, l'animal sera euthanasié. Le recours à l'euthanasie sera déclenché si les points limites étaient atteints. Les procédures n'excéderont pas 3 mois dans la grande majorité des cas et pourront aller jusqu'à 1 an lors des quelques expériences d'efficacité à long terme du traitement. Les souris seront systématiquement euthanasiées en fin de procédure.

14996 Le Cancer du Poumon Non à Petites Cellules est la principale cause de décès par cancer dans le monde. La majorité des patients présentent un stade avancé de la maladie au moment du diagnostic, et sont traités par chimiothérapie ou radiothérapie, éventuellement en association avec l'immunothérapie ou des thérapies ciblées. Toutefois, en dépit des traitements, la survie à cinq ans n'est que de 15%, ce qui est principalement dû aux métastases. Les nouveaux traitements basés sur l'immunothérapie, visent à bloquer des récepteurs inhibiteurs des lymphocytes intra-tumoraux, et sont utilisés avec une efficacité relative chez environ 30% des patients. Par ailleurs, parmi les patients qui répondent au traitement, certains développent des résistances secondaires. Ainsi, malgré l'efficacité de l'immunothérapie, il est indispensable de poursuivre les recherches pour mieux connaître les facteurs pouvant impacter la progression tumorale et les phénomènes de résistance aux traitements.

Les mutations les plus courantes chez l'homme pour ce type de cancer est l'activation du gène K-ras. Nous souhaiterions utiliser de l'Uréthane qui est connu pour activer le proto-oncogene Kras et permettre le développement de tumeur pulmonaire.

Des études épidémiologiques ont analysé un lien potentiel entre les infections respiratoires, l'inflammation chronique et le cancer du poumon. Parmi les virus respiratoires retrouvés en pathologie humaine, le virus respiratoire syncytial (RSV) est fréquemment incriminé.

Sur la base de ces données, nous pensons que les infections virales respiratoires peuvent avoir un impact sur l'évolution des tumeurs pulmonaires. Nous souhaitons donc travailler sur un modèle de tumeurs pulmonaires dont l'évolution est progressive afin d'étudier les effets des infections virales respiratoires

- sur l'incidence et la progression tumorale pulmonaire,
- sur la réponse immunitaire anti-tumorale
- sur la réponse aux traitements par thérapies combinatoires (chimio/immuno-thérapies).

Pour l'ensemble du projet, nous utiliserons 1230 BALB/cJRj. Tous les animaux demandés pour ce projet seront utilisés.

La règle des 3R sera appliquée

Replace (Remplacer) les modèles animaux pour ces expériences, les modèles animaux ne peuvent pas être remplacés car nous étudions les effets d'infections virales sur la progression des tumeurs pulmonaires dans un organisme où le système immunitaire joue un rôle important.

Reduce (Réduire) le nombre d'animaux en expérimentation les expériences seront regroupées pour limiter le nombre des animaux des groupes contrôles.

Refine (Raffiner) la méthodologie utilisée, ce qui implique la notion de points limites (critères d'interruption, ou "end-points") des points limites ont été établis, pour définir à quel moment sacrifier les animaux au cours des expériences, si des signes de souffrances sont visibles. Nous nous préoccupons également de réduire, supprimer l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'angoisse. La souche de souris sélectionnée BALB/cJRj est basée sur les données de la littérature.

14997 Le diabète de type 1 (DT1) est une maladie chronique se déclarant chez le jeune enfant ou l'adolescent et provenant de la destruction auto-immune des cellules sécrétant l'insuline au sein des îlots pancréatiques endocrines. Cette maladie concerne plus de 20 millions d'individus dans le monde (OMS) et son incidence est en pleine croissance. L'insulinothérapie quotidienne la plus souvent efficace pour traiter l'hyperglycémie caractéristique de cette maladie est contraignante et des complications multiples peuvent se développer à long terme (rénales, cardio-vasculaires, oculaires). Certaines complications graves à plus court terme, comme l'hypoglycémie, peuvent survenir chez 30% des DT1 et sont associées à des comas et une mortalité précoce chez certains patients présentant un diabète très instable (« Brittle » diabetes, 3/1000 DT1). L'allo-transplantation d'îlots pancréatiques humains dans le foie via la veine porte hépatique est une alternative à l'insulinothérapie et devient un complément indispensable à la régulation de la glycémie chez les diabétiques instables. Cependant, trois obstacles majeurs empêchent la généralisation de cette approche thérapeutique à l'ensemble des DT1 : le manque de pancréas humains, la perte de viabilité de plus de la moitié des îlots greffés lors de l'injection et la nécessité d'instaurer un traitement immunosuppresseur systémique pour éviter le rejet des îlots greffés.

Nous développons actuellement, afin de pouvoir lever ces obstacles, un pancréas bio-artificiel innovant sourcé en oxygène, pouvant embrayer des îlots pancréatiques humains ou porcins macro-encapsulés dans un hydrogel et transplanté en sous-cutanée. L'encapsulation protège de la réponse immune (permettant l'absence d'immunosuppression) et apporte une matrice extracellulaire favorable à la survie des îlots. Le site sous-cutané permet une implantation peu invasive, le retrait potentiel et l'échange (en cas d'arrêt de la fonction insulino-sécrétrice des îlots greffés). Le site sous-cutané est validé par le traitement par insulinothérapie administrée justement sous la peau. Cependant, la limite du site sous-cutané est la faible quantité d'oxygène disponible durant les 14 jours nécessaires à la néo-vascularisation autour du greffon. Cette période hypoxique et le transfert nécessaire d'oxygène au travers de l'hydrogel altèrent la fonctionnalité des îlots greffés. C'est pourquoi, apport et transfert maîtrisés d'oxygène dans le pancréas bio-artificiel après greffe sous-cutanée sont un défi majeur pour la survie des îlots pancréatiques à long terme. Nous avons précédemment développé et optimisé une solution d'apport d'oxygène délivré aux îlots pancréatiques encapsulés de manière physiologique, montrant *in vitro* un gain fonctionnel majeur de ces îlots en situation hypoxique. Cette optimisation nous a permis de mettre en œuvre et d'obtenir un prototype de pancréas bio-artificiel modélisé pour la souris et extrapolable à une taille supérieure (modèle porcine) puis à l'Homme.

L'objectif de cette étape dans le développement d'un tel pancréas bio-artificiel incorporant des îlots pancréatiques porcins est d'évaluer son efficacité à court et long terme chez la souris diabétique et un modèle porcine. Pour cela, nous devons disposer d'îlots porcins. La procédure d'isolement des îlots pancréatiques de porcelet qui fait l'objet de cette demande d'autorisation a déjà obtenu un avis éthique favorable en 2015 ayant permis l'optimisation avec succès de notre pancréas bio-artificiel. Au total, cette étape de développement sera réduite à 30 porcelets "donneurs" de

pancréas. Dans un souci de réduction du nombre d'animaux, le nombre d'animaux indiqué ici est le minimum garantissant a priori une exploitation statistique des résultats et leur reproductibilité, et couvre l'évaluation du pancréas bio-artificiel dans les modèles murins et porcins (ces tests font l'objet d'une autre demande d'autorisation car développés dans un autre établissement utilisateur). Pour un souci de remplacement, et en lien avec la réduction du nombre d'animaux utilisés, les évaluations à court terme de la correction du diabète seront réalisées avec des organoïdes d'îlots pancréatiques développés *in vitro* à partir d'une lignée cellulaire. Dans un souci de raffinement, les animaux seront transportés dans des conditions standardisées et adéquates de température, d'hygrométrie, et de boisson. Le prélèvement du pancréas se fait sous anesthésie générale sans réveil de l'animal.

14998 Le diabète de type 2, en constante augmentation dans notre société, est un problème majeur de santé publique. Le diabète de type 2 est une complication métabolique associée à l'obésité, qui est une augmentation excessive de la masse de tissu adipeux. Le tissu adipeux participe au contrôle de la glycémie (taux de sucre dans le sang) d'un individu. Le développement excessif du tissu adipeux perturbe les fonctions de l'adipocyte, cellule majoritaire du tissu adipeux, qui ne peut plus remplir sa fonction pour le maintien de la glycémie. Lors d'un apport alimentaire accru en énergie, on observe un changement d'expression d'un grand nombre de protéines dans l'adipocyte. Certaines des protéines dont l'expression est augmentée perturbent les fonctions de l'adipocyte en agissant sur des voies de signalisations. Nous voulons étudier une de ces protéines, dont l'expression est augmentée dans l'adipocyte de souris génétiquement obèses ou soumises à un régime riche en lipides, et chez l'homme obèse, et déterminer si cette augmentation d'expression est responsable de la perte de contrôle de la glycémie chez la souris. Nous savons que l'augmentation d'expression de cette protéine dans un adipocyte en culture altère la fonction de l'adipocyte ce qui pourrait donc se produire lors de l'obésité et donc participer à la perte de contrôle de la glycémie. Nous devons donc maintenant invalider cette protéine uniquement dans l'adipocyte pour en déterminer les conséquences dans un organisme entier. Nous utiliserons un modèle génétique de souris invalidées pour cette protéine uniquement dans l'adipocyte, nous soumettrons les souris à un régime riche en lipides et déterminerons les conséquences sur le contrôle de la glycémie, et identifierons les voies de signalisations et les protéines régulées par cette protéine dans les adipocytes, qui pourraient participer au contrôle de la glycémie.

L'ensemble de ce travail nous permettra de découvrir si la protéine que nous étudions et la voie de signalisation qu'elle contrôle sont impliquées dans l'apparition des désordres glycémiques chez la souris obèse et si l'inhibition de cette protéine et la voie de signalisation qu'elle contrôle sont à considérer pour le traitement du diabète de type 2. Au final ce projet présentera un rapport avantages/dommages positif puisqu'il doit contribuer à améliorer nos connaissances des mécanismes moléculaires impliqués dans le développement du diabète de type 2 chez l'homme lors de l'obésité en utilisant (i) des modèles de souris établis (fond génétique pur C57Bl6) qui ne présente pas de phénotypes dommageables et (ii) des procédures expérimentales qui n'affectent que faiblement les conditions de vie des souris. Ce projet nécessitera au maximum 624 souris pour l'ensemble des procédures.

La règle des 3Rs est donc prise en compte ici de la façon suivante : pour satisfaire à la réduction, la procédure prévoit d'utiliser le nombre minimum d'animaux nécessaires à des études statistiques pertinentes. Pour le raffinement, l'hébergement sera réalisé dans des locaux appropriés et les personnes réalisant les procédures sont autorisées et appliqueront les règles d'éthiques. L'environnement sera enrichi pour diminuer le stress. Le suivi sanitaire régulier permettra d'identifier, le plus rapidement possible, les souris souffrantes et de prendre les mesures nécessaires. Enfin, conformément au principe de remplacement, notre hypothèse a été précédemment éprouvée *in vitro*. Il nous faut maintenant l'étudier dans un contexte plus physiologique, or il n'existe pour l'instant pas de modèle *in vitro* qui pourrait remplacer l'expérimentation sur un organisme entier.

14999 La mortalité des veaux est un fléau connu des éleveurs, dans certains élevages cette mortalité peut atteindre 25%. Cela est en partie expliqué par le fait que les anticorps de la mère ne sont pas transférés au veau via le placenta au cours de la gestation. Les veaux naissent sans anticorps. Le tube digestif du veau est capable de laisser passer les anticorps maternels seulement les 48 premières heures de vie, ensuite il devient imperméable aux anticorps maternels. Par la suite, le veau est capable de fabriquer lui-même ses propres anticorps. Pendant l'allaitement, les anticorps sont transférés au veau via le colostrum, et en fonction de la qualité de ce colostrum, le veau sera plus ou moins bien protégé contre les parasites, bactéries et autres virus responsables d'une diarrhée. Il existe plusieurs alternatives à un colostrum pauvre. La supplémentation avec un colostrum enrichi en anticorps, la vaccination des mères... mais ces alternatives sont coûteuses.

Par ailleurs, la fabrication des fromages entraîne une grosse production de lactosérum (petit lait) qui a été longtemps considéré comme un déchet. Depuis quelques années ce lactosérum est de plus en plus valorisé. Le lactosérum est composé d'eau, de sucre, et d'anticorps. Ces anticorps en très faible quantité peuvent être thermo activés par un procédé mis au point au laboratoire. Cette activation des anticorps permet d'augmenter leur réactivité envers plusieurs cibles.

L'idée est donc d'utiliser les anticorps présents dans le lactosérum, les activer pour les rendre réactifs envers différentes cibles, et les administrer aux veaux, les protégeant ainsi d'une diarrhée. Ce procédé pourrait permettre de valoriser un « déchet » de l'industrie fromagère et de diminuer la mortalité des veaux.

Pour valider cette théorie, nous souhaitons gaver des souriceaux dès leurs premiers jours de vie. Chez les souris, contrairement aux veaux, les anticorps sont transférés in utero aux souriceaux par le placenta. Après la naissance, les anticorps maternels continuent de passer du lait vers la circulation sanguine pendant 12 à 15 jours. Nous souhaitons gaver les souriceaux avec du lactosérum activé pendant leurs 15 premiers jours de vie. Les souriceaux seront ensuite mis à mort et les anticorps bovins (issues du lactosérum thermoactivé) seront dosés dans le sérum. Cette étape nous permettra de répondre à la question suivante les anticorps activés sont-ils capables d'être transférés du lactosérum vers le nouveau-né. La seconde étape est de vérifier si ces anticorps activés sont capables de protéger d'une infection. Pour cela, une infection sera engendrée chez les souriceaux.

Les procédures subies par les souriceaux (obtenus au laboratoire) seront des gavages de lactosérum activé avec une sonde adaptée et un volume injecté adapté. Les anticorps bovins seront dosés à partir du sérum récolté.

La seconde partie des expérimentations aura lieu sur des souris sevrées. L'infection sera engendrée le 21ème jour. Chaque souris sera observée quotidiennement, vérification de la prise hydrique et alimentaire, la consistance des fèces. Le poids, la température, la fréquence respiratoire et la fréquence cardiaque seront également évalués chaque jour. Lors de l'observation quotidienne de ces souris les symptômes suivants seront notés capacité à se déplacer, consistance des fèces, poils souillés, piloérection, prostration, sursauts.

Tout sera mis en oeuvre pour assurer le bien-être des souris, ambiance, soins et enrichissement dans des cages adaptées à chaque phase de ce projet (raffinement). L'utilisation de 20 portées de souriceaux pour la partie 1 et 6 portées de souriceaux pour la partie 2 est nécessaire et suffisante pour obtenir des résultats exploitables (réduction). Le transfert passif d'anticorps issus d'un lactosérum vers la circulation sanguine et la protection contre une infection ne peuvent être étudiés qu'*in vivo* (remplacement). Les souris seront maintenues dans un cycle jour/nuit de 12h, à une température de 22 +/- 2°C et une hygrométrie de 55 +/- 20%. Elles disposeront de nourriture et d'eau ad libitum. Un contrôle quotidien sera réalisé. En cas d'observations de symptômes cliniques tels que prostration, piloérection, dos vouté, température corporelle < 34°C, les souris seront mises à mort selon une méthode réglementaire.

Pour ce projet, nous achèterons 10 femelles et 5 mâles chez notre fournisseur habituel. Les 26 portées nécessaires à ce projet seront obtenues par reproduction, au sein de notre laboratoire. Etant donné qu'une portée de souris peut varier entre 4 et 9 souriceaux, le nombre de souris

utilisées dans ce projet peut varier de 119 (4 x 26 portées +15 parents) à 249 (9 x 26 portées + 15 parents).

15000 De nombreuses études ont montré que les tumeurs développent des mécanismes d'échappement au système immunitaire en inhibant certains points de contrôle. Les immunothérapies de première génération sont des traitements qui ciblent ces points de contrôle à l'aide d'anticorps afin de réactiver la réponse immunitaire. Elles ont démontré leur efficacité parfois à très long terme notamment chez 30% des patients atteints d'un mélanome métastatique. Cependant ces immunothérapies peuvent entraîner une forte toxicité par le déclenchement de maladies auto-immunes, conséquence de leur mode d'administration systémique. Pour contrer cette toxicité, des essais d'injections directement dans la tumeur sont en cours en clinique.

Par ailleurs, d'autres technologies ciblant les points de contrôle immunitaires sont en cours de développement et notamment une technologie appelée « anti sens », plus adaptée à l'administration locale intralésionnelle et donc moins toxique. Elle est également moins coûteuse et pourrait être efficace chez un plus grand nombre de patients. Cette technologie consiste à injecter un composé qui va bloquer la production d'une protéine cible, empêchant ainsi l'inhibition du système immunitaire par la tumeur.

L'objectif de ce projet est de démontrer l'efficacité *in vivo* de 7 composés anti sens dans trois modèles murins de mélanome. Ces modèles ont été choisis suivant leur degré de sensibilité aux immunothérapies classiques afin de mimer les différentes réponses obtenues chez les patients.

Les souris recevront une greffe sous-cutanée de cellules cancéreuses, permettant d'obtenir un modèle rapide et reproductible, avec une mesure de la croissance tumorale directe et des métastases rares.

Tout d'abord nous testerons l'absence de toxicité d'un composé anti sens contrôle (n'ayant aucune cible) dans un des modèles souris de mélanome, afin de valider l'utilisation de cette molécule *in vivo*. Cette étape ne nécessitera qu'un seul groupe d'animaux.

Ensuite, l'évaluation de chaque composé sera divisée en deux grandes étapes. Nous rechercherons pour chaque composé et dans chaque modèle, la dose minimum et l'intervalle optimal entre deux injections donnant un effet maximal sur la croissance tumorale.

Après cette étape d'optimisation, nous évaluerons l'efficacité de chacun des composés en utilisant la dose et l'intervalle choisis, en comparaison avec le traitement de référence de même cible, dans chaque modèle. Pour cela, nous analyserons la croissance tumorale, la réduction de la quantité de la cible ainsi que la composition de l'environnement tumoral.

L'objectif est de démontrer une efficacité égale ou supérieure de l'un ou plusieurs des composés anti sens, avec une toxicité réduite, en comparaison avec les immunothérapies de première génération.

Le projet prévoit l'utilisation de 1656 souris au total sur 5 ans.

Le protocole expérimental respecte la règle des 3R remplacement, réduction et raffinement. Le recours aux animaux est indispensable pour ce projet et ne peut pas être remplacé par des modèles *in vitro* car il est nécessaire d'utiliser des modèles permettant d'étudier les maladies et leurs traitements sur des systèmes vivants comparables par de nombreux aspects au corps humain. La variété et la complexité des cancers, ainsi que leur incidence élevée, rendent l'utilisation de modèles animaux cruciale pour comprendre comment le cancer se développe et pour améliorer les stratégies préventives, de diagnostiques et thérapeutiques.

Les animaux seront surveillés tous les jours lors des procédures qui sont raffinées par l'établissement de points limites précoces, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire. De plus, des médications appropriées (anesthésiques et analgésiques) seront utilisés lors des greffes et des injections de composés pour réduire la douleur.

Des études préliminaires sur cultures cellulaires et sur un autre modèle de souris ont permis de minimiser les tests d'optimisation et de cibler les analyses à effectuer et ainsi réduire le nombre

d'animaux nécessaires à l'obtention de résultats statistiques significatifs. Ainsi, le nombre d'animaux a été défini pour utiliser le minimum d'animaux possible.

15001 La leucémie aiguë promyélocytaire (LAP) est un cancer des cellules de la moelle osseuse et du sang, déclenché par une anomalie génétique qui conduit à la production d'une protéine anormale, qui est nécessaire et suffisante pour déclencher la leucémie. En utilisant des approches pharmacologiques et génétiques, il a été formellement démontré que la combinaison de deux agents thérapeutiques, entraînant la dégradation de cette protéine anormale, est responsable de l'éradication définitive de la maladie. Il a également été montré que cet effet thérapeutique nécessite également la forme normale de la protéine PML. Nous cherchons maintenant à caractériser plus précisément les mécanismes d'action de ces deux médicaments.

Notre projet de recherche s'articule autour de deux axes. Le premier doit nous permettre d'identifier quelle partie de la protéine PML normale est nécessaire et suffisante pour que la combinaison thérapeutique soit efficace. Le second cherche à étudier si le système immunitaire est nécessaire à l'effet thérapeutique. L'ensemble des résultats nous permettront d'acquérir de nouvelles connaissances fondamentales sur la LAP et sur les mécanismes d'action de cette thérapie.

Pour mener à bien ce projet, nous utiliserons deux modèles expérimentaux. Le premier consistera à injecter par voie intra-veineuse (veine de la queue sur souris éveillées) des cellules tumorales murines exprimant la forme anormale de la protéine ainsi qu'une forme mutée de la protéine PML normale. Après estimation du développement de la leucémie par palpation de la rate (splénomégalie), les souris seront traitées ou non par différents agents thérapeutiques, administrés soit par injections intra-péritonéales quotidiennes (sur souris éveillées), soit par implantation d'une capsule-médicament à libération programmée sur 21 jours directement sous la peau en une seule intervention (chirurgie réalisée sous anesthésie générale). En fonction des différents buts expérimentaux, les animaux seront donc traités de 3h à 21 jours et seront suivis quotidiennement durant toute la durée de l'expérience. Le second modèle consiste à injecter des cellules leucémiques à des souris dépourvues de système immunitaire (ensemble des éléments permettant la reconnaissance et la défense de l'organisme contre les agents pathogènes). Ces animaux seront alors soumis aux mêmes traitements de référence (administration intra-péritonéale et/ou chirurgie pour l'implantation de la capsule médicament). Si nous observons toujours l'éradication de la maladie, cela signifiera que les traitements n'impliquent pas le système immunitaire.

Ce projet de recherche s'inscrit dans le respect de la règle des 3 R. En effet, nous avons réalisé le maximum de tests *in vitro*. Cependant le recours à un modèle animal est maintenant indispensable pour analyser le processus complexe de progression tumorale dans un système physiologique qui tient compte de l'environnement dans lequel ces cellules se développent. Par ailleurs, nos cohortes d'animaux seront réduites au minimum après estimation des effectifs basée sur les données antérieures du laboratoire et une simulation statistique afin de garantir l'obtention de résultats statistiquement recevables. Nous utiliserons au maximum 2072 souris sur les 5 ans que durera le projet (1936 souris pour le premier axe dont 440 pour la génération des souris donneuses de moelle osseuse et 136 souris dépourvues de système immunitaire).

Les animaux seront hébergés en groupes pour respecter leur comportement grégaire. Nous aurons recours à l'anesthésie/analgésie pour l'implantation sous-cutanée. Une grille d'évaluation de leur comportement sera tenue et différents critères seront scorés quotidiennement de façon à définir des points limites de douleur/souffrance précoces. En cas de détection de modifications de comportement pouvant être associées à une douleur, un analgésique sera donné et si aucune amélioration n'est observée en 24h, l'animal sera euthanasié. Le recours à l'euthanasie sera déclenché si les points limites étaient atteints. Les procédures n'excéderont pas 3 mois dans la grande majorité des cas, mais pourront aller jusqu'à 1 an lors des quelques expériences d'efficacité à long terme du traitement. Les souris seront systématiquement euthanasiées en fin de procédure.

15002 Les fonctions cognitives sont générées par le traitement de l'information dans le cortex cérébral. Les circuits corticaux sont constitués de différents types de neurones reliés entre eux par un très grand nombre de connexions qui sont responsables de la propagation de l'information. Les

neurones peuvent transmettre une excitation (entraînant l'activation d'un autre neurone) ou inhiber un autre neurone. Le résultat est la création de réseaux fonctionnels complexes, qui produisent des rythmes électriques, sous-tendant les mécanismes de la cognition.

Dans ce contexte, une balance précise entre excitation et inhibition est fondamentale pour le bon fonctionnement du cerveau. Des maladies neurologiques et psychiatriques très graves peuvent se développer lorsque cet équilibre est modifié.

Parmi tous les types cellulaires du cortex cérébral, les neurones corticaux inhibiteurs (également connus sous le nom d'interneurones, qui utilisent le neurotransmetteur GABA) sont très hétérogènes et peuvent être classés selon des critères anatomiques et électrophysiologiques précis.

Notre équipe étudie comment les neurones du cortex cérébral se connectent les uns aux autres, et comment ces connexions synaptiques contribuent à la genèse de différentes formes d'oscillations du réseau neuronal.

Notre travail permettra une meilleure compréhension de la régulation de l'excitabilité des interneurones et leur rôle au sein des réseaux du cortex cérébral.

L'espèce utilisée sera la souris. Pendant la durée du projet (5 ans) un total de 4950 souris seront utilisées. La règle des 3R a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée sur le terrain 1) réduction, le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum pour nous permettre de générer des données statistiques solides 2) raffinement, les procédures prennent en compte les temps de récupération et des nombres d'essais visant à réduire le stress et la fatigue des animaux 3) remplacement, les études *in vitro* et sur animaux invertébrés ne permettent pas l'étude de comportements complexes, le rongeur est donc une des espèces les plus appropriées.

Les conditions de stabulation suivent les règles imposées par le comité d'éthique et l'autorité nationale française et EU. En bref, le nombre d'animaux par cage est déterminé en fonction de leur taille et de leur poids, avec maximum 6 animaux par cage. L'enrichissement consiste, pour les stocks d'un carré de coton et pour les croisements un carré de coton et une maisonnette de carton. Tous les animaux seront élevés avec eau et nourriture à volonté. Tous les animaux provenant d'un éleveur auront une semaine d'acclimatation avant toute procédure.

15003 La myopathie myotubulaire est une maladie congénitale très sévère des muscles squelettiques. Cette pathologie affecte 1 garçon sur 50 000, n'a aucun traitement et conduit dans la majorité des cas au décès prématuré du patient. Elle est due à des mutations dans le gène *Mtm1* qui code pour la myotubularine, une protéine essentielle pour le fonctionnement du muscle. Dans la pathologie, l'absence de myotubularine entraîne une désorganisation de l'architecture intracellulaire des fibres musculaires, et une faiblesse musculaire, qui affecte aussi les muscles respiratoires. La détresse respiratoire est très sévère et est à l'origine du décès des patients.

Afin de pouvoir étudier la myopathie myotubulaire dans un modèle le plus similaire possible à l'être humain, nous avons créé un modèle de cette maladie chez le rat, appelé *Mtm1-KO*. Les animaux portent une mutation dans le gène *Mtm1* qui empêche la production de la protéine myotubularine par conséquent, ils développent la myopathie myotubulaire.

Une première caractérisation du nouveau modèle de rat *Mtm1-KO* a permis de mettre en évidence une réduction de l'espérance de vie, ainsi que des problèmes respiratoires. De plus, les muscles squelettiques des rats atteints par cette maladie présentent une désorganisation des fibres musculaires, dont le muscle respiratoire, le diaphragme. Afin de vérifier que cette désorganisation a des conséquences sur la fonction du muscle, nous voulons mesurer la fonction des muscles dans une nouvelle étude.

L'utilisation d'animaux est indispensable pour faire des preuves de concept thérapeutiques, car les modèles cellulaires de la maladie ne permettent pas d'étudier les défauts liés à la fonction du muscle (perte de force non mesurable sur des modèles cellulaires, pas de remplacement possible). A l'opposé, le modèle de rat qui sera utilisé dans ce projet reproduit la pathologie musculaire avec fidélité.

Afin de raffiner nos études, un aliment hydratant et nourrissant sera placé au sol dans la cage afin de faciliter l'accès aux rats malades. En cours de protocole, des anesthésiques seront administrés au moment des prélèvements de sang et de muscle, et lors des prélèvements de muscles pour les tests de mesure de force sur muscle isolé.

Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés dans cette étude, les mêmes rats seront utilisés pour les tests moléculaires et les tests histologiques. Le nombre de rats nécessaire a été estimé à 8 rats par groupe par une étude statistique prédictive (test de comparaison des moyennes). Les rats seront élevés et reproduits dans notre établissement utilisateur. Notre projet durera 2 ans et nécessitera l'utilisation totale de 108 rats.

15004 Le cancer est à ce jour la seule pathologie chronique majeure pour laquelle la plupart des patients sont obligés de se rendre à l'hôpital pour recevoir leur traitement. Pour les autres pathologies chroniques telles que les maladies cardiovasculaires, l'asthme, le diabète ou le VIH, le patient se procure son traitement à la pharmacie la plus proche et gère de manière autonome la prise de son traitement. Cette différence est liée à la voie d'administration des médicaments. Pour les maladies précitées, ils sont disponibles sous forme de comprimés, d'inhalations, voire d'injections sous-cutanées comme l'insuline pour les diabétiques. Pour la majorité des anticancéreux, ces voies d'administration simples qui rendent le patient autonome pour son traitement, n'existent pas. Ils doivent être administrés par perfusions intraveineuses qui se déroulent sur plusieurs heures. Celles-ci se font soit sur une voie veineuse centrale avec pose d'une chambre implantable, soit par perfusion veineuse périphérique. Elles nécessitent une reconstitution du produit à la pharmacie de l'hôpital et la pose par une infirmière. De plus, sachant que les anticancéreux doivent être administrés à intervalle régulier toutes les 1 à 3 semaines, ce mode de prise en charge est contraignant pour le patient, d'autant plus qu'il est généralement assez rare d'avoir un hôpital spécialisé dans le traitement du cancer à proximité du domicile. Cette prise en charge a aussi un coût important lié à la complexité du circuit et des problèmes organisationnels se posent car le nombre de patients atteints de cancer est en constante augmentation. Le développement de nouvelles voies d'administration est primordial pour permettre la prise en charge du patient à domicile. Deux voies d'administrations sont principalement utilisées dans ce but la voie orale et la voie sous-cutanée (SC). La première est certainement la plus développée car elle a l'avantage d'être facile d'utilisation avec les formes de type comprimés ou gélules. Son inconvénient principal est que la biodisponibilité (quantité de principe actif qui se retrouve dans le sang) est faible, variable et difficilement prévisible. Ces problèmes ont limité l'utilisation de ces formes orales. Nous pensons sur ce point que la voie SC est supérieure à la voie orale car elle permet une biodisponibilité plus élevée et mieux contrôlée.

Notre but est de développer une nouvelle approche permettant d'administrer efficacement les chimiothérapies déjà présentes sur le marché par voie SC et non par voie intraveineuse.

Pour cela, nous développons une nouvelle technologie de prodrogue polymère qui permet d'améliorer l'absorption des molécules par voie SC.

Cette technologie consiste à coupler chimiquement le principe actif (PA) à un polymère innovant afin de modifier les propriétés physico-chimiques de la molécule thérapeutique et ainsi maximiser son absorption. Les études auront 2 buts, étudier la toxicité et caractériser la pharmacocinétique

- Les études de toxicité nous permettront de connaître le profil de toxicité de nos prodrogues polymère, et de vérifier qu'elles permettent d'éviter les toxicités au niveau du point d'injection.
- Les études de pharmacocinétique nous permettront de modéliser le devenir de nos prodrogues polymère (absorption, distribution, métabolisation, élimination). Elles permettront aussi de vérifier qu'il est possible d'avoir une exposition au principe actif comparable à la voie intraveineuse, pour avoir une efficacité égale.

A ce jour, il n'existe pas de méthode alternative à l'expérimentation animale pour l'étude de l'innocuité SC et de la pharmacocinétique par cette voie d'administration. Durant leur transport dans l'organisme depuis le site d'administration, les médicaments sont soumis à une métabolisation hépatique, rénale etc...qui peut provoquer l'apparition de métabolites issus de la dégradation

pouvant être plus ou moins actifs voire toxiques. La réponse d'un organisme entier n'est à l'heure actuelle pas remplaçable par une modélisation ou une analyse *in vitro*. Il est donc indispensable d'évaluer la concentration en principe actif dans le sang et l'effet de ceux-ci localement au niveau du tissu SC et sur animal entier pour tenir compte de ces phénomènes.

Les études préliminaires *in vitro* permettront le criblage de différentes formulations et seul un nombre limité de formulations seront testées *in vivo*, ce qui permet une réduction du nombre de ces animaux. Une planification statistique minutieuse permet de réduire le nombre d'animaux tout en préservant la validité statistique de l'étude. Pour la réalisation de l'étude de pharmacocinétique nous utiliserons 144 souris + 144 rats sur 5 ans. Des points limites d'expérience ont été identifiés en amont de la mise en place de ce projet afin de limiter la douleur et le mal-être des animaux.

15005 La dépression est un problème de santé publique majeur dans les pays développés. En France, une personne sur cinq est sujette à ces troubles et un tiers d'entre elles sont résistantes aux antidépresseurs classiques. Des travaux très récents ont montré que la kétamine était capable d'agir très rapidement sur les symptômes de la dépression chez les personnes profondément atteintes et résistantes aux traitements classiques. En effet, des essais cliniques ont démontré son efficacité de manière rapide et durable chez les patients en impasse thérapeutique. Cependant, la kétamine peut provoquer des effets secondaires pouvant être très graves (comme des hallucinations ou des troubles cardiovasculaires) et son mécanisme d'action reste encore mal connu. Une des hypothèses actuelles suggère que l'activation des récepteurs de la sérotonine 5-HT_{1A} serait impliquée dans son activité antidépressive. Ainsi, l'utilisation de molécules qui agissent sur ces récepteurs apparaît comme une piste thérapeutique très prometteuse. Dans cette voie, de nouvelles molécules sont en cours de développement comme la molécule α . Ainsi, notre projet consiste, par l'utilisation de l'imagerie fonctionnelle, à identifier les mécanismes contribuant à l'effet thérapeutique de la kétamine et de la molécule α afin de développer de nouveaux candidats médicaments dans la dépression.

Le projet vise donc à répondre à plusieurs questions cruciales pour comprendre le mécanisme d'action antidépresseur de la kétamine et de la molécule α dans le but de développer de futures thérapies

- Quels sont les mécanismes contribuant à l'effet thérapeutique de la kétamine ? Quel est le lien avec les récepteurs 5-HT_{1A} ?
- Quels sont les mécanismes contribuant à l'effet thérapeutique de la molécule α ?
- Quelle est la proportion de récepteurs 5-HT_{1A} ciblée par la molécule α à dose thérapeutique ?
- Quelle est la cinétique de la molécule α dans le cerveau à dose thérapeutique ?

Pour ce faire, nous utiliserons un modèle de rat sain sur lequel nous utiliserons la tomographie par émission de positons (TEP). Cette technique est non invasive et transposable à l'humain et permet d'effectuer plusieurs examens par animal (respectant la règle de raffinement des 3Rs). L'imagerie fonctionnelle ultrasonore (fUS) sera également employée. Cette technologie nouvelle permet de visualiser les modifications de flux sanguin cérébral avec une résolution spatiale et temporelle encore inégalée.

Ce projet de recherche fondamentale et translationnelle, d'une durée de 5 ans, nécessitera un total de 88 rats répartis en trois procédures TEP (deux de gravité légère et une sans réveil) et une procédure d'imagerie ultrasonore sans réveil. Les résultats obtenus permettront de répondre à l'ensemble des questions expérimentales du projet avec une puissance statistique suffisante pour les observations attendues tout en se limitant aux expériences indispensables (règle de Réduction des 3Rs).

Il n'est pas possible de recourir à des modèles *in vitro* ou *in silico* pour mener à bien nos expériences qui seraient trop simplifiés pour la découverte des mécanismes d'action des différentes molécules (règle de Remplacement des 3Rs). L'utilisation d'un modèle animal est essentiel en termes de fiabilité des résultats et de transposabilité à l'Homme. Toutefois, des études d'autoradiographie seront menées *in vitro* pour obtenir des informations complémentaires.

15006 La dissémination métastatique des cellules cancéreuses est la principale cause de décès chez les patientes atteintes du cancer du sein avec un taux de survie à 5 ans de 20% (contre 87% pour cancer du sein localisé). On considère encore de nos jours que le cancer du sein métastatique est une maladie incurable. L'élucidation des mécanismes cellulaires et moléculaires qui sous-tendent ce processus est donc un enjeu majeur dans la recherche sur le cancer. Les tumeurs mammaires présentent un écosystème cellulaire complexe maintenu par des cellules souches cancéreuses (CSCs) qui représente la graine tumorigène de la maladie. Ces CSCs sont résistantes aux thérapies conventionnelles (chimiothérapie, radiothérapie) et de nombreuses études suggèrent que les CSCs contiennent la population métastatique et seraient donc responsables du développement de métastases. Ces cellules ont la capacité à disséminer dans la circulation sanguine en tant que cellules tumorales circulantes mais aussi à aller coloniser de nouveaux organes et de s'y développer. La compréhension du phénomène métastatique représente donc un objectif capital dans la recherche cancérologique. Mieux comprendre le rôle des CSCs dans ce processus permettrait de développer de nouvelles approches thérapeutiques afin d'améliorer la prise en charge des patientes atteintes de cancer du sien.

Dans le but de reproduire le plus fidèlement possible l'ensemble du processus du développement métastatique, nous utiliserons préférentiellement une méthode permettant l'obtention de métastases spontanées : les cellules cancéreuses seront transplantées au niveau de la glande mammaire (orthotopique) chez l'animal afin de reproduire, d'aussi près que possible, les conditions naturelles du développement de la pathologie. Dans le cas de ces prélèvements agressifs, l'apparition de métastases pourra être observée quelques semaines après la greffe mais nécessitera le plus souvent l'ablation de la tumeur primaire qui pourrait engendrer une gêne trop importante pour l'animal. Les souris seront alors traitées avec les candidats médicaments anti-CSCs afin d'évaluer leur éventuel effet sur le nombre de métastases qui se sont développées.

Certains modèles de xénogreffes primaires ne conduisant pas au développement de métastases spontanées, nous utiliserons une méthodologie alternative visant à obtenir des métastases expérimentales qui consiste à injecter les cellules tumorales dans la circulation sanguine et à estimer le nombre de métastases (en général pulmonaires) formées après administration des traitements à évaluer.

Tout au long de nos expérimentations, nous appliquerons la méthode des 3R= remplacement, réduction, raffinement. Avant toute expérimentation *in vivo*, les différents composés à évaluer seront testés *in vitro* sur des modèles de tumoresphères et de migration cellulaire à partir de lignées tumorales et de prélèvements de patientes. Afin de réduire à son minimum le nombre d'animaux tout en permettant de fournir des résultats statistiquement significatifs, nous calculerons le nombre minimal de sujets nécessaires à l'aide d'un test d'effectif. Toujours dans un souci de réduction du nombre d'animaux, lorsque possible, les groupes contrôles d'animaux recevant seulement le solvant du composé à évaluer seront commun à plusieurs tests d'efficacité. Du point de vue du raffinement, le suivi du développement tumoral se fera par des mesures cinétiques utilisant des procédés non invasifs la mesure du volume tumoral de la tumeur primaire à l'aide d'un pied à coulisse et l'imagerie par bioluminescence pour les métastases. De même, les procédures de transplantation, de résection et d'imagerie seront réalisées sous anesthésie. Les animaux seront suivis quotidiennement. L'apparition de signes d'inconfort ou d'éventuelle souffrance nous conduira à choisir l'action appropriée à mener en fonction d'une grille de score de leur bien-être. Enfin, afin de réduire le stress et d'améliorer le cadre de vie des animaux, nous optimiserons les conditions de leur hébergement, par la présence d'enrichissement dans les cages (copeaux de bois compactés et/ou coton), et par le maintien des animaux en groupes de 4 à 5 afin de respecter leur instinct grégaire.

Pour ce projet qui s'inscrit dans la recherche de nouvelles formes thérapeutiques dans le traitement du cancer du sein nous avons estimé pouvoir gérer au maximum 3 études de ce type par an pendant 5 ans, le nombre maximal d'animaux utilisé au cours de cette période sera donc de 2 400 souris.

15007 Clostridium difficile est la première cause de diarrhées bactériennes associées aux soins chez l'adulte dans les pays développés et en particulier en France (24000 cas par an, dont 14 % de

formes compliquées). La mortalité associée aux infections à *C. difficile* (ICD) est de l'ordre de 3%. Les ICD peuvent évoluer sur un mode épidémique avec la survenue de cas groupés d'infection. Elles représentent un coût sanitaire important pour nos sociétés, en raison de l'augmentation des durées moyennes de séjours hospitaliers et des surcoûts associés à leur prise en charge spécifique.

Trois molécules antibiotiques sont utilisées dans le traitement des ICD elles sont généralement efficaces mais chacun de ces traitements présente des inconvénients (échecs de traitement risque de sélection de bactéries résistantes coût important d'une des molécules). De plus, l'infection à *C. difficile* est caractérisée par un taux de récurrences important (20%), avec parfois des épisodes de récurrences multiples, ce qui peut être très invalidant pour les patients avec une perte en qualité de vie significative.

Dans ce contexte, la recherche pour trouver de meilleures stratégies thérapeutiques est toujours très active. Le métronidazole fait partie des traitements recommandés.

Depuis quelques années, une moins bonne réponse au métronidazole est observée, avec notamment plus d'échecs thérapeutiques.

Après administration orale, le métronidazole est rapidement absorbé. Les concentrations dans le sang obtenu après administration orale sont similaires à celles obtenues après administration intraveineuse de doses équivalentes. Par conséquent, les concentrations au niveau du colon, correspondant au site d'infection de *C. difficile*, sont très faibles.

Cette modification de sensibilité de certaines souches au métronidazole associée à sa faible biodisponibilité au niveau du site infectieux, démontre bien le besoin actuel de développer une nouvelle stratégie d'administration du Métronidazole, seule alternative thérapeutique actuelle à la vancomycine et à la fidaxomicine.

L'objectif est donc de développer un système permettant d'obtenir de fortes concentrations de métronidazole au niveau du colon à l'aide d'un système particulier de libération de cet antibiotique c'est à dire une vectorisation du métronidazole.

Il est donc nécessaire de réaliser une évaluation préclinique des systèmes de libération du métronidazole et de vérifier leur efficacité dans un modèle hamster d'infection. En effet, celui-ci reproduit les formes les plus graves d'ICD digestives qui sont observées chez l'homme.

L'objectif de ce projet est donc d'obtenir une preuve de concept de l'efficacité *in vivo* de ces formes vectorisées, préalable indispensable à la poursuite des autres étapes du développement clinique.

Dans ce projet qui inclut des rongeurs (hamsters femelles adultes), nous estimons avoir besoin d'utiliser 336 animaux maximum au total. Sur la base de notre expérience et de la littérature conséquente déjà disponible, nous avons déterminé le nombre d'animaux nécessaire et suffisant à l'obtention de résultats statistiquement exploitables. Nous réduisons au maximum le nombre de répétition d'essais.

Lors de cette expérimentation, l'état de santé des animaux sera surveillé quotidiennement afin de suivre au mieux l'évolution de la colite induite par les protocoles expérimentaux et optimiser le bien-être des animaux. Des points limites ont été établis et mèneront à l'euthanasie des animaux les ayant franchis. Le milieu de vie des animaux est enrichi.

15008 Titre du projet UTILISATION DES ANTICORPS THERAPEUTIQUES HUMANISES ANTI-TRPV6 CONTRE LE CANCER

Contexte de la recherche

TRPV6 est un canal très sélectif pour le calcium faisant parti de la famille TRP. Grâce à sa haute sélectivité pour le calcium par rapport aux autres canaux TRP, il a été montré que ce canal participe grandement à la régulation de l'homéostasie calcique dans le corps. TRPV6 intervient comme étant la première étape dans le mécanisme transcellulaire qui est impliqué dans beaucoup de processus tels que l'absorption de calcium dans l'intestin et la réabsorption dans le rein. Un vaste ensemble de preuves suggère que la surexpression de TRPV6 doit être un fait commun dans les cancers d'origine épithéliale. Lorsque l'on compare avec des tissus ou cellules normales, l'expression de ce

canal est considérablement augmentée dans le tissu cancéreux prostatique, dans les carcinomes humains du côlon, du sein, de la thyroïde et des ovaires.

Les niveaux d'expression de TRPV6 corrént positivement avec la progression de la tumeur et son agressivité comme indiqué par le stade pathologique et le score de Gleason des tumeurs de prostate. Il a été montré que TRPV6 est directement impliqué dans le contrôle de la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques en augmentant les taux de prolifération et de survie. De plus, les patients atteints de cancer du sein présentant des hauts niveaux de TRPV6 ont une survie diminuée comparé aux patients avec une faible expression de TRPV6. La surexpression du canal TRPV6 a été associée avec un stade précoce de cancer du côlon, et l'inhibition de l'expression de TRPV6 inhibe la prolifération et induit l'apoptose dans les cellules cancéreuses de côlon.

En dépit de la découverte de son rôle crucial dans la prolifération et la survie des cellules cancéreuses *in vitro*, aucun outil fiable ciblant le canal TRPV6 *in vivo* n'a été reporté à ce jour pour être utilisé comme thérapie efficace contre les cancers cités.

Résumé de la recherche

Le principal but de cette étude est d'élaborer des outils efficaces *in vivo* tel que des anticorps monoclonaux humanisés capables de cibler et de supprimer les tumeurs surexprimant TRPV6. Trois objectifs spécifiques doivent être atteints afin d'accomplir le but principal.

- 1) Humanisation et maturation d'affinité des anticorps murins testés précédemment *in vitro* et *in vivo* afin de préparer l'anticorps et ses clones respectifs pour la preuve du concept.
- 2) Preuve du concept *in vitro* en utilisant plusieurs lignées cancéreuses issues de la prostate, pancréas, sein, intestin, thyroïde, etc... en utilisant les tests de survie et l'apoptose, ainsi que des tests fonctionnels comme électrophysiologie et l'imagerie calcique.
- 3) Ciblage *in vivo* de plusieurs lignées cellulaires de cancers différentes greffées entre les omoplates dans les souris immunodéprimées telles que swiss nudes en utilisant les anticorps monoclonaux humanisés en ayant un aperçu des possibles voies/mécanismes où l'inhibition du canal TRPV6 ou, au contraire, leur activation sont impliquées.

Résumé d'Expérimentation Animale :

Les souris immunodéprimées telles que swiss nudes sont couramment utilisées en oncologie dans les testes des anticorps monoclonaux humanisés, seront utilisées. Elles sont humanisées, ce qui permet l'injection de cellules tumorales humaines ainsi qu'effectuer le traitement par mAbs humanisés. Toutes les manipulations avec des animaux seront soumises au règlement européen, ainsi que aux règles des 3R. Pour réduire le nombre d'animaux au maximum, 10 souris par groupe avec 6 groupes par protocole sera nécessaire pour réaliser un test de Wilcoxon requis pour ce type d'étude. Les 4 protocoles expérimentaux (lignées du cancer précis) seront employés en utilisant en total 480 souris. Pour raffiner les expériences, l'enrichissement sera mis dans la cage, tel que des tunnels ce qui permettra de diminuer le stress chez l'animal ainsi que la douleur, la souffrance et l'angoisse infligées, augmenter sa capacité à s'adapter à l'environnement. Lorsque le point limite de tumeur est atteint (tumeur >2000mm³, poids faible.), l'animal sera sacrifié par injection de pentobarbital après anesthésie par isoflurane.

Enjeux en matière de cancérologie et de santé publique

L'application la plus importante de ce projet sera l'anticorps monoclonal humanisé afin de cibler spécifiquement et de stopper les tumeurs humaines surexprimant TRPV6. La séquence de l'épitope sera brevetée pour le traitement du cancer de la prostate et les autres cancers. Comme l'implication de TRPV6 a déjà été démontrée dans de nombreux cancers humains, l'anticorps généré peut être testé dans de nombreux types de cancers pour élargir son utilisation thérapeutique. Pour finir, les anticorps testés pourraient être modifiés et utilisés comme thérapie seule ou en combinaison contre différents cancers chez l'humain.

15009 Les déficits dans le traitement et le comportement sensoriel sont associés aux maladies neurologiques et neuropsychiatriques humaines incluant l'autisme, la schizophrénie, les crises d'angoisse et dépressions. Une meilleure compréhension des mécanismes fondamentaux du

développement et plasticité des systèmes sensorielles et cognitives post-naissance pourrait donc conduire à une nouvelle approche thérapeutique, plus performante pour l'homme. Pour cela, nous étudions la régulation des mécanismes de plasticité cognitive dans le cerveau. Ces mécanismes sont beaucoup trop complexes pour être étudiés par de simples systèmes de cultures il faut un cerveau complet d'un organisme modèle tel que la souris, qui est génétiquement très connue et assez proche de l'homme.

Nous utilisons le système limbique des souris comme modèle. Nous allons induire un stress chez les souris juvéniles pour les rendre anxieuses à l'âge adulte. En parallèle, pour altérer l'activité de certains neurones, nous allons changer le niveau d'expression de certaines protéines dans leur cerveau par injection précise de molécules. Nous utiliserons des conditionnements sociaux pour évaluer comment les neurones s'adaptent et contrôlent le comportement. Sur la base de notre expérience antérieure, nous prévoyons d'utiliser 10 souris par condition expérimentale afin d'obtenir une puissance statistique satisfaisante. Les procédures ont été optimisées (utilisation des mâles et femelles, plusieurs tests par animal, réutilisation de certains animaux dans différentes expériences) afin de minimiser le nombre d'animaux, qui sera au maximum 2250.

Ces interventions nécessitent des procédures de classe modérée. Pour toutes nos expériences, les souris sont anesthésiées selon les bonnes pratiques vétérinaires. Toute souris ayant subi une expérience sous anesthésie est ensuite placée dans des conditions enrichies pour son bien-être. 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. Les points limites sont décrits pour chaque procédure. Les souris sont hébergées dans une animalerie récemment rénovée. Elles sont sous contrôle de la température et de la lumière (en cycle jour/nuit). Elles bénéficient de l'équipement complet pour leur bien-être (cotons pour leur nid, nourriture et eau libre d'accès, nourriture plus riche si besoin). Les visites pour veiller à leur bien-être sont journalières. Les animaux seront utilisés uniquement pour ce projet.

Ce projet nous permettra de mieux comprendre la régulation des mécanismes de plasticité cognitive dans le cerveau suite au stress subis pendant l'enfance.

15010 L'insuffisance cardiaque est une pathologie très grave pour laquelle il existe encore un manque de médicaments efficaces. Plusieurs médicaments récents utilisés pour réguler la glycémie des patients diabétiques (gliflozines) ont démontré qu'ils avaient aussi un effet majeur contre la mortalité cardiovasculaire et plus précisément contre l'insuffisance cardiaque indépendamment de leur effet antidiabétique.

Cependant le mécanisme d'action de ces molécules n'est pas bien identifié. Une cible potentielle appelée NHE1 est suspectée mais nous n'avons pas encore de preuves définitives.

Il a été récemment montré qu'une souris qui exprime de façon continue la protéine NHE1 développe une insuffisance cardiaque. Le travail envisagé propose de mesurer chez ces souris l'effet de 2 de ces médicaments antidiabétiques absorbés dans l'eau de boisson. Les contrôles seront des souris sauvages. Le développement de la maladie sera évalué par une technique non invasive (échographie cardiaque) sur animal vivant et analyse histologique post mortem.

Le projet nécessite 80 souris.

Remplacement : Pour caractériser l'effet des médicaments sur l'insuffisance cardiaque, il n'existe pas de marqueur pour des études *in vitro*. Il est donc indispensable d'utiliser un modèle animal *in vivo*.

Réduction : Pour réduire le nombre d'animaux à utiliser des expériences préalables ont été réalisées dans lesquelles la variabilité interindividuelle a été évaluée permettant aujourd'hui de savoir le nombre de souris nécessaires pour obtenir des résultats fiables (statistiquement).

Raffinement : Nos souris seront hébergées en portoir ventilé, dans des conditions qui favorisent l'expression de leurs comportements naturels petits groupes sociaux, cages enrichies d'éléments

pour construire un nid ou de favoriser l'exploration (litière, petites maisons ou tunnels en carton, frisures de papier).

Pour leur examen par échographie les animaux seront endormis par un anesthésique léger afin de limiter le traumatisme d'une contention longue (plusieurs minutes).

15011 La transplantation cardiaque est le traitement de référence de l'insuffisance cardiaque avancée réfractaire au traitement pharmacologique. Cependant le nombre de greffons est actuellement limité, avec seulement un organe pour deux receveurs en attente. Le prélèvement de donneurs décédés d'arrêt circulatoire contrôlé, correspondant à la catégorie 3 de la classification de Maastricht (M3), offre un potentiel majeur d'augmentation du nombre de transplantations cardiaques (Annexe 1). Plus de 120 transplantations cardiaques à partir de donneurs M3 ont été effectuées depuis 2014 à travers le Monde avec 86% à 90% de survie à 1 an, soit un résultat comparable à la transplantation à partir de donneurs conventionnels en état de mort encéphalique. Le cœur prélevé sur donneur M3 est cependant soumis à des contraintes durant la phase agonique précédant l'arrêt circulatoire pouvant mettre en péril le succès de la transplantation cardiaque. La viabilité du cœur doit par conséquent être systématiquement évaluée sur machine de perfusion ex vivo avant d'envisager la transplantation du greffon. Cette évaluation se base actuellement sur l'analyse du taux de lactate circulant, dont la sensibilité et la spécificité sont imparfaites. Nous souhaitons développer une approche innovante, actuellement non pratiquée en France l'analyse métabolomique du greffon cardiaque. La métabolomique est une étude analytique du métabolome, c'est-à-dire un ensemble de petites molécules incluant des métabolites primaires (acides aminés, sucres et lipides) et des métabolites secondaires (hormones, acides organiques).

Notre étude a deux objectifs principaux

1) Définir de nouveaux biomarqueurs de viabilité myocardique pour aider à la décision de transplanter ou non un greffon prélevé sur un donneur à risque.

2) Mettre en évidence des voies métaboliques impliquées dans la séquence ischémie-reperfusion pour ouvrir des perspectives thérapeutiques d'optimisation pharmacologique des greffons cardiaques destinés à être transplantés.

L'ensemble des procédures chirurgicales sera réalisé sous anesthésie générale avec un mélange couvrant les composantes hypnotiques et analgésiques de l'anesthésie et conforme aux principes de l'expérimentation animale.

Tous les cœurs seront placés sur machine de perfusion ex vivo et reperfusés avec du sang préalablement recueilli sur l'animal donneur afin de limiter le nombre d'animaux et respecter les règles de compatibilité sanguine. Des prélèvements plasmatiques et tissulaires respectivement sur le liquide de perfusion et sur le myocarde seront répétés à intervalles réguliers pendant la durée perfusion ex vivo pour permettre une analyse cinétique du métabolisme myocardique et ses corrélations avec les métabolites circulants dans le plasma. Après une période de 4 heures de reperfusion, les cœurs seront retirés de la machine de perfusion pour être analysés en histologie à la recherche de lésions ischémiques et inflammatoires, ainsi que pour quantifier l'œdème myocardique de reperfusion.

Seul un modèle animal permettra d'apporter cette analyse tissulaire, la réalisation de biopsies myocardiques étant inenvisageable sur un greffon cardiaque humain destiné à la greffe car elles induiraient des saignements et des lésions fonctionnelles irréversibles qui provoqueraient une défaillance primaire du greffon et donc un échec de la transplantation cardiaque.

Aucune étude scientifique ne permet à ce jour de répondre à ces deux objectifs. Il n'existe pas à notre connaissance de modèle alternatif à l'expérimentation animale pour l'analyse du métabolisme myocardique dans ce contexte de perfusion d'organe isolé. Nous utiliserons un modèle porcin de prélèvement cardiaque puis de mise sur machine de perfusion extracorporelle. Le choix du gros animal repose sur la proximité avec la physiologie et le métabolisme humains, mais également sur la congruence anatomique des vaisseaux du cœur (aorte, artère pulmonaire) avec le circuit de perfusion extracorporelle tel qu'utilisé en pratique clinique. Nous utiliserons au maximum 22 porcs de 40 kg pour cette étude.

Dans un souci de réduction du nombre d'animaux, les cœurs du groupe ME seront prélevés sur des porcs utilisés pour une autre étude en cours dans notre laboratoire portant sur la surveillance synchrone de la pression intracrânienne et de l'hémodynamique pour optimiser la prise en charge du traumatisé crânien grave.

15012 Les études épidémiologiques mettent en évidence un lien entre l'exposition aux rayonnements ionisants à des doses modérées (> 500 mGy, exposition aigue) et le développement de pathologies cardiovasculaires notamment les pathologies cérébrovasculaires, de la circulation et ischémiques, dans les situations post-accidentelles.

Les études expérimentales ne montrent pas de lien entre l'exposition chronique à très faibles doses de rayonnements ionisants et le développement de l'athérosclérose.

Le stress est un des premiers facteurs de risque cardiovasculaire. Il a été montré qu'un stress psychosocial est associé à une aggravation de l'athérosclérose et peut entraîner des AVC et des infarctus.

Aucune étude n'a cependant mis en évidence la réponse d'une co-exposition associant rayonnements ionisants et un facteur de risque tel que le stress sur la pathologie athéromateuse et les conséquences sur la vascularisation cérébrale.

Par une approche *in vivo* nous allons exposer des souris transgéniques ApoE^{-/-} (qui développent spontanément des plaques d'athérosclérose, ce qui n'est pas le cas des souris sauvages) aux rayonnements ionisants gamma à faibles doses (dose cumulée de 70mGy et 150mGy) chronique (6μGy/h) et induire dans le même temps un stress (dans ce projet, le stress est l'exposition à la litière sale de rat). A l'issue de cette co-exposition l'objectif sera d'évaluer

- Le phénotype de plaques d'athérome (taille, nombre, composition)
- Le profil moléculaire des vaisseaux et du sang (approches métabolomique, inflammation)
- La vascularisation cérébrale (densité vasculaire et l'inflammation cérébrale)

Ce projet prévoit l'utilisation de 650 souris sur 5 ans.

Afin de réaliser ce travail, l'utilisation d'animaux est nécessaire car nous voulons connaître l'effet de rayonnements ionisants sur une pathologie à l'échelle de l'organisme entier. Dans ce cas, l'étude sur les cellules n'est pas suffisamment représentative d'un organisme intégré et ne peut mimer une pathologie globale.

Un nombre suffisant d'animaux est utilisé afin d'avoir une puissance statistique suffisante et des résultats exploitables.

Les procédures utilisées suivent la réglementation afin de limiter l'impact sur le bien-être des animaux suivi des animaux, enrichissement adapté et hébergement en groupes réduits pour limiter agressions entre congénères, raffinement de la méthode de prélèvement de sang.

15013 L'objectif de ce projet est d'étudier l'efficacité d'une chimiothérapie vaporisée dans l'abdomen par une méthode innovante la PIPAC (Pressurized IntraPeritoneal Aerosol Chemotherapy). Cette technique a été mise en oeuvre à partir de 2013 et consiste en l'administration de chimiothérapies sous forme d'aérosol, dans l'abdomen du patient, par voie laparoscopique (coelioscopie) donc minimalement invasive, au bloc opératoire. La vaporisation doit améliorer la distribution des agents de chimiothérapie dans la cavité abdominale, et l'application sous pression devrait augmenter la pénétration locale de la chimiothérapie.

Elle est utilisée chez l'homme pour le traitement des carcinomes péritonéaux (présence de très nombreux foyers tumoraux qui ne peuvent pas tous être retirés par le chirurgien). Ce type de cancer disséminé est en général le signe d'une maladie très évoluée et associée à une faible survie (médiane de survie de 3 à 12 mois). Actuellement, le traitement a visée curative de la carcinose péritonéale repose sur la chirurgie de réduction tumorale (pas toujours aisée pour retirer l'ensemble des nodules cancéreux) combinée à la chimiothérapie intrapéritonéale (administrée sous forme liquide directement dans l'abdomen).

La PIPAC constitue ainsi une approche nouvelle et de ce fait a été mise en oeuvre de façon relativement empirique avec très peu de données disponibles dans la littérature et des effets parfois délétères chez l'homme par manque de connaissance du mode d'action et des doses de chimiothérapie à administrer par cette méthode.

Dans ce contexte, et pour répondre à la demande de chercheurs travaillant sur la prise en charge de la carcinose péritonéale d'origine ovarienne ou colorectale, nous souhaitons développer un modèle de carcinose d'origine ovarienne ou colorectale chez la souris, déterminer la dose efficace d'une chimiothérapie administrée par la voie classique intrapéritonéale sur les 2 types de carcinose, et enfin comparer avec l'efficacité du traitement PIPAC sur les 2 types de carcinose en comparaison de la voie IP (intra péritonéale).

La présente saisine concerne donc 186 souris maximum, qui seront explorées par imagerie échographique et imagerie de bioluminescence.

Dans ce projet, d'après notre expérience aucun dommage n'a été observé suite à l'apparition de foyers tumoraux au niveau abdominal car les animaux sont mis à mort avant que les foyers tumoraux puissent générer un gêne ou une douleur à l'animal. Une surveillance pointue des animaux et la détermination de points limites pertinents seront néanmoins mises en place pour anticiper tout stress ou douleur générés chez nos animaux.

Ce projet sera mené conformément à la règle des 3R examens d'imagerie non invasive sur animaux sous anesthésie générale, qui ne susciteront pas de stress important à l'animal. Les examens d'imagerie n'entraînent pas de douleur. Les traitements PIPAC seront également réalisés sous anesthésie générale et un antalgique sera administré (raffiner). Le nombre d'animaux sera limité à 186 souris maximum (réduire). La possibilité de réaliser par imagerie un suivi longitudinal au cours du temps nous permet également de réduire le nombre de vies animales mises en jeu. La mise en oeuvre de modèles animaux pour les études d'efficacité reste nécessaire car il n'existe pas à l'heure actuelle de modèles représentatifs de la complexité d'un organisme entier ni de cette pathologie. La modélisation du dépôt d'aérosols est une discipline complexe et à notre connaissance il n'existe pas de modèle de PIPAC *in vitro* (remplacer).

15014 Le développement neural regroupe l'ensemble des processus qui accompagnent la croissance du système nerveux depuis les stades embryonnaires jusqu'à la mise en route des fonctions cérébrales. Comprendre comment le cerveau se met en place est un enjeu majeur en médecine car un grand nombre de maladies neurologiques sont liées à des anomalies du développement. Nous utiliserons la connectivité rétine-cerveau comme modèle. Une grande partie des études se feront sur des cultures cellulaires *in vitro*. Toutefois les études des mécanismes participant au développement des projections rétinienne ne peuvent pas être réalisées exclusivement sur des cultures primaires de rétine. La complexité du réseau de neurones qu'est le système nerveux ne peut être reproduite *in vitro*, ce qui nécessite l'expérimentation *in vivo*. Le nombre total de souris utilisées dans ce projet est estimé à 568 souris gestantes et 4544 souriceaux, pour 5 ans. Le nombre d'animaux utilisé est le minimum requis pour atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ». Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries pour détecter tout signe de stress et/ou douleur qui pourrait nuire à la santé de l'animal. Des points limites précis ont été élaborés pour arrêter les procédures s'ils sont atteints. Les méthodes d'euthanasie adaptées seront utilisées en fin de procédure. Toutes les souris ont à disposition des carrés de cellulose, une maisonnette et des bâtons à ronger. Nous utiliserons également toutes les techniques nécessaires afin de limiter ou supprimer la douleur au cours de ces procédures par des méthodes d'anesthésie et d'analgésie adaptées.

15015 La sclérose en plaques (SEP) est une maladie auto-immune du système nerveux central. Elle se caractérise par une attaque de la myéline des patients par leur propre système immunitaire. Une composante neurodégénérative, en lien avec la démyélinisation, contribue également à la mise en place des symptômes. Il existe plusieurs formes de SEP dans la majorité des cas, le décours de la maladie se distingue par la succession de périodes de poussées et de rémissions, de durée et de

fréquence variables, correspondant à des cycles d'apparitions de symptômes et de récupération totale ou partielle dans un nombre plus restreint de cas, la maladie se déroule selon une aggravation constante des symptômes, sans cycle de poussées et rémissions.

D'un point de vue physiopathologique, les cycles de poussées et rémissions correspondent à des phases de démyélinisation et de remyélinisation, associés à des statuts neuroinflammatoires différents. Des dommages axonaux, constituant la composante neurodégénérative de la maladie apparaissent au cours de celle-ci, et peuvent conduire à des dommages irréversibles.

Plus de deux millions de personnes sont touchées par cette maladie dans le monde, dont 100 000 en France. L'apparition de la SEP se situe typiquement entre 20 et 40 ans. Elle constitue pour cette raison la deuxième cause de handicap moteur du jeune adulte.

La prise en charge de la maladie consiste en des traitements de la poussée (corticothérapie) et des traitements de fond, associant kinésithérapie et prise en charge médicamenteuse. Si cette prise en charge permet d'améliorer la qualité de vie des patients, il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement médicamenteux permettant de guérir la SEP.

L'objectif principal du présent projet est de tester une nouvelle stratégie thérapeutique visant à améliorer la remyélinisation et ainsi proposer des nouveaux traitements dans cette pathologie.

Cette étude basée sur l'expérimentation animale prend en compte le bien-être animal et les pratiques éthiques, et répond à la règle des 3 R (remplacer, réduire, raffiner) comme décrit ci-dessous

Notre projet correspond à l'étape de validation *in vivo* d'une stratégie thérapeutique, qui fait suite aux validations réalisées *in vitro*, et ne nous permet donc pas d'utiliser d'autres moyens que de tester notre modèle chez l'animal. La souris est l'espèce animale la plus étudiée dans le domaine de la sclérose en plaques. La communauté scientifique dispose pour ces études d'un modèle animal reproduisant en partie les caractéristiques de la SEP et plus spécifiquement les processus de démyélinisation et de remyélinisation chez la souris. L'ensemble des connaissances et des acquis dont nous disposons au laboratoire et dans la littérature grâce à ce modèle rend la souris particulièrement intéressante pour étudier la SEP.

Ainsi, les procédures expérimentales décrites dans ce projet ont un caractère de stricte nécessité et ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau d'information. Toutes les procédures seront organisées afin de réduire l'inconfort et le stress liés à la manipulation de l'animal. Toutes les procédures douloureuses seront réalisées sous anesthésie générale associée à une couverture analgésique pour limiter au maximum les sensations de douleur. De plus, l'association d'une étude de puissance statistique basée sur la littérature ainsi que l'utilisation de techniques d'évaluation non invasive comme l'IRM permettront de réduire drastiquement le nombre d'animaux utilisés (n=105). Le bien-être des animaux sera suivi quotidiennement par du personnel formé 7j/7. Les animaux sont hébergés dans des cages standards aux normes européennes suite à la chirurgie. Les principes éthiques et les standards de raffinement sont utilisés jusqu'à la mise à mort de l'animal.

Le nombre total d'animaux à utiliser pour ce projet est de 105 souris.

- 15016** Les inflammations de l'oreille externe, ou otites externes, sont des affections courantes chez le chien et sont d'origine multifactorielle. Elles font intervenir des facteurs favorisants, en particulier l'irritation du conduit auditif, des facteurs déclenchants, et des facteurs perpétuants (surinfection bactérienne et/ou fongique). Le modèle d'otite externe développé ici consiste à provoquer une irritation du conduit auditif externe suivi de l'administration *in situ* d'un inoculum comportant au moins une espèce pathogène bactérienne et/ou fongique. Une première étape consiste à documenter l'expression clinique de l'otite en fonction de la méthode d'irritation et des caractéristiques de l'inoculum et de l'inoculation. Un modèle bien défini d'otite permet ensuite l'évaluation de produits vétérinaires pour le traitement des otites externes : détermination de l'efficacité des posologies d'administration d'un produit (dose par administration et durée d'administration).

Mots clés chien, modèle expérimental, otite externe, *Malassezia pachydermatis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*

- Raison du projet Les inflammations de l'oreille externe, ou otite externe, sont des affections courantes chez le chien et sont d'origine multifactorielle. Elles font intervenir des facteurs favorisants, en particulier l'irritation du conduit auditif, des facteurs déclenchants, et des facteurs perpétuants (surinfection bactérienne et/ou fongique). Parmi les agents perpétuants, on peut citer *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius*, *Streptococcus* spp, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* et *Malassezia pachydermatis*. Le projet a pour finalité l'évaluation de l'efficacité de produits vétérinaires dans le traitement des otites externes du chien.

- Objectif du projet : reproduction expérimentale d'une otite externe avec facteurs perpétuants bactériens et/ou fongiques dans le but d'évaluer l'efficacité et l'innocuité de médicaments vétérinaires ou d'autres produits à usage sanitaire.

- Animaux Ce modèle est développé chez le chien. Le sexe n'a a priori pas d'importance. Le nombre d'animaux nécessaire sera calculé de façon à ce que les effets attendus puissent être détectés avec une puissance statistique adéquate (0.8 en général). Le nombre de groupes pourra varier selon les objectifs spécifiques de l'étude. D'une façon générale, l'unité statistique sur laquelle sont appliqués les traitements et récoltés les données sera l'oreille externe (possibilité d'utiliser les deux oreilles). Il s'agit d'études comparatives avec analyse en supériorité 2 à 3 groupes seront constitués et le nombre d'unités statistiques par groupe sera compris entre 4 et 12, soit un effectif maximum de 36 animaux par étude avec une oreille inoculée par chien. Considérant que le nombre moyen d'études envisagées par an est de 1, nous tablons sur un nombre "enveloppe" de 180 animaux maximum sur la période de 5 ans. Il s'agit d'un maximum, le nombre de chiens pourrait être réduit en utilisant deux oreilles par animal, selon le type de produit étudié.

- Dommages attendus En l'absence de traitement adéquat, l'otite externe peut devenir chronique (souffrance chronique) ou s'étendre à l'oreille moyenne ou interne. En dehors de ces complications, l'otite ne doit provoquer qu'un gêne passager. La souffrance attendue est donc considérée comme modérée.

- Application des 3Rs

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

. Réduction le nombre d'animaux utilisé sera optimisé et calculé de façon à ce que les effets attendus puissent être détectés avec un niveau de significativité adéquat. L'utilisation de modèles statistiques permettant de prendre en compte la corrélation pouvant exister entre les deux oreilles d'un même animal permettra de réduire le nombre de chiens nécessaire par étude tout en conservant un nombre d'unités statistiques adéquat.

. Raffinement l'hébergement sera adapté aux besoins physiologiques des animaux et permettra l'expression de leur gamme normale de comportements. Hébergement en groupe, interactions quotidiennes avec le personnel, sorties possibles, de manière à améliorer le bien-être des animaux et à favoriser leur placement ultérieur. La contention visera à minimiser le stress et le bien-être sera évalué biquotidiennement par le personnel en charge des animaux.

15017 Les sarcomes des tissus mous (STS) sont des cancers rares mais agressifs, représentant 1% des tumeurs solides de l'adulte. La survie globale médiane des sarcomes avancés est comprise entre 12 et 18 mois et le taux de réponse moyen aux chimiothérapies est de 10 – 20%. Les connaissances actuelles sur le microenvironnement tumoral des STS sont très limitées et les essais cliniques d'immunothérapie ne donnent pas toujours des résultats satisfaisants. L'efficacité des immunothérapies étant tributaire de l'interaction des cellules immunitaires infiltrant les tumeurs, il est donc nécessaire d'analyser en détail le microenvironnement tumoral des sarcomes composé de cellules lymphocytaires infiltrant les tumeurs, de macrophages tumoraux ou encore de cellules myéloïdes suppressives et également composé de structures lymphoïdes tertiaires.

Les sarcomes comprennent plus de 70 sous-types histologiques, tous avec une signature biologique unique, ce qui augmente la difficulté d'une analyse complète. Nous avons récemment démontré qu'indépendamment de leurs sous-types histologiques, les STS peuvent être divisés en 5 classes immunitaires de sarcomes (classes A à E) en fonction de la composition de leur microenvironnement tumoral. Nous avons également révélé qu'une des classes (E) possède une signature de cellules immunitaires plus élevée et des structures lymphoïdes tertiaires (TLS) plus nombreuses. Ces caractéristiques semblent corrélées avec les réponses thérapeutiques au traitement anti-PD-1, un inhibiteur de points de contrôle immunitaire.

Les mécanismes de régulation des réponses immunitaires et de la composition du microenvironnement tumoral au cours des immunothérapies vont être analysés afin d'identifier les facteurs prédictifs de réponse aux immunothérapies. Récemment, il a été montré que la déplétion des macrophages tumoraux par la trabectedine pourrait induire une augmentation de l'efficacité de l'immunothérapie par les anticorps anti-PD1 dans les sarcomes métastatiques. Par conséquent, l'impact de la déplétion des macrophages tumoraux, le phénotype et la fonction des cellules lymphocytaires infiltrant les tumeurs, des macrophages tumoraux ou encore des cellules myéloïdes suppressives seront analysés avant et après le traitement anti-tumoral (avec l'anticorps anti-PD1) *in vivo*.

Afin d'analyser et d'étudier la déplétion des macrophages tumoraux ainsi que le développement des structures lymphoïdes tertiaires dans les sarcomes et l'impact de ces changements sur les traitements anti-tumoraux, il est nécessaire de développer *in vivo* des modèles de sarcomes murins pour ensuite les traiter avec les anticorps anti-PD1 et/ou avec la trabectedine. Nos résultats dans ce projet fourniront une analyse exhaustive du microenvironnement tumoral des sarcomes et devraient révéler les mécanismes immunosuppresseurs des STS qui sont essentiels pour le développement des futures stratégies thérapeutiques. Pour répondre à tous les objectifs de ce projet nous aurons différentes procédures en utilisant des molécules à visées thérapeutiques dans nos différents modèles de sarcomes murins.

Pour l'ensemble du projet (3 ans), nous utiliserons 2950 souris. Tous les animaux demandés pour ce projet seront utilisés.

Conformément à la directive 2010/63/UE et des arrêtés du 1er février 2013, les règles de bien-être animal et la théorie des 3R seront respectées et se portera ainsi

1) Remplacer les modèles animaux est parfois possible en travaillant sur des cellules ou des tissus (*in vitro*) ou encore sur des modèles numériques (*in silico*). Le recours aux modèles *in vitro* ou *in silico* doit être l'objectif du chercheur si l'objectif de son expérimentation le permet. Les applications *in vitro* ne permettent pas de répondre entièrement à nos objectifs car des cellules isolées ne peuvent refléter la complexité du système immunitaire, de la vascularisation et du microenvironnement tumoral. L'expérimentation animale est ainsi nécessaire afin d'étudier ces interactions complexes au sein d'une tumeur et de chercher des cibles thérapeutiques. Les modèles animaux ne peuvent pas être remplacés car nous étudions la progression des tumeurs dans les sarcomes ainsi que la composition du microenvironnement tumoral dans un modèle de sarcome murin où le système immunitaire et le microenvironnement jouent un rôle primordial. De plus, les souris ont été choisies comme modèle expérimental car notre traitement reconnaît aussi bien les protéines humaines et murines. L'efficacité d'un traitement ne peut être évaluée que sur un organisme entier pour ne pas se restreindre à un effet observé dans un système cloisonné. Ceci ne peut donc pas être étudié *in vitro*.

2) Réduire le nombre d'animaux en expérimentation. Cet objectif vise à diminuer le nombre d'animaux utilisés à des fins de recherche par la limitation aux seules expériences considérées comme absolument indispensables, la réduction des répétitions inutiles d'études antérieures, la rédaction d'un protocole expérimental avant toute expérimentation, sachant qu'une étude bien préparée rend souvent inutile d'autres essais sur les animaux. Les expériences seront regroupées pour limiter le nombre des animaux des groupes contrôles. De plus, l'expérience acquise dans d'autres modèles tumoraux et l'anticipation des doses adéquates à injecter par l'étude bibliographique permettent de réduire le nombre de souris utilisées.

3) Raffiner signifie optimiser l'expérimentation grâce à la méthodologie appliquée aux animaux il s'agit de réduire, supprimer ou soulager leur douleur ou leur détresse, et ainsi d'améliorer leur bien-être. En amont de l'expérience, raffiner consiste à choisir avec soin le modèle animal utilisé, améliorer les conditions de transport et d'élevage. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et adaptées en accord avec le personnel de l'animalerie. Une attention particulière sera portée au raffinement de l'environnement des animaux. Leur nombre ne dépassera pas les 2 à 5 souris par cage, et l'environnement sera complété avec du matériel afin de créer un environnement non stressant pour l'animal (les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification et/ou tunnels en cartons). De plus, des points limites (ou critère d'arrêt anticipé) de la procédure ont été établis, pour définir à quel moment sacrifier les animaux au cours des expériences, si des signes de souffrances sont visibles.

15018 Malgré des avancées majeures dans le traitement du mélanome métastatique, avec l'arrivée des thérapies ciblant les anomalies moléculaires dans les cellules tumorales puis de l'immunothérapie visant à remobiliser les défenses immunitaires, beaucoup de patients ne répondent pas favorablement à ces traitements. En effet, ils présentent une résistance dès le début du traitement (résistance dite primaire) ou après avoir répondu favorablement pendant un certain temps (résistance secondaire).

Notre équipe a montré, il y a quelques années, qu'un complexe protéique appelé eIF4F était impliqué dans la résistance de tumeurs de patients aux thérapies ciblées dans le mélanome métastatique.

Nous souhaitons désormais étudier l'implication de ce complexe dans la réponse immune antitumorale. Les premiers tests in-vitro, en laboratoire, sur des modèles cellulaires montrent que ce complexe joue un rôle dans la régulation de certaines protéines qui jouent un rôle dans l'inhibition de la réponse immunitaire. Ainsi, en bloquant ce complexe nous pourrions bloquer ces protéines et lever l'inhibition pesant sur le système immunitaire. Ces résultats sont encourageants.

La question posée par ce projet nécessite d'avoir accès à la complexité de l'environnement microtumoral. Ceci n'est possible que sur un animal vivant entier. De même, ce projet fait appel à des études en lien avec la réponse immune dans l'organisme entier.

Les contraintes pour les animaux seront l'implantation de tumeurs par voie sous-cutanée. Ces tumeurs seront suivies strictement quotidiennement et les expériences arrêtées précisément à l'atteinte de signes prédéfinis (dont la taille maximale de tumeur). Nous réaliserons des expériences sur des souris en analysant un maximum de paramètres sur un maximum d'organes afin d'optimiser au mieux l'utilisation de chaque animal dans le respect de la règle des 3R. Le nombre de souris total maximal prévu est de 1952 sur 5 ans. Ce nombre pourra être revu à la baisse grâce à une étude pilote qui permettra de définir les meilleures conditions et le nombre minimum de souris permettant d'observer des résultats statistiquement significatifs.

Les résultats obtenus pourront être appliqués ensuite dans des études cliniques, chez l'humain, avec des molécules inhibitrices en cours de développement. Tous ces travaux ont pour objectif de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques contre le cancer.

15019 Comprendre comment les phénotypes et les comportements cellulaires sont contrôlés constitue un challenge majeur en biologie moderne. Les réponses cellulaires sont issues des caractéristiques des réseaux moléculaires intracellulaires nature et dynamisme des interactions moléculaires, motifs de régulation (rétro-contrôles, boucle de pro-action), modules ou éléments de sous-réseaux pouvant être considérés comme des entités fonctionnelles indépendantes. Le « dialogue » au sein de ces réseaux moléculaires repose sur des modifications post-traductionnelles (e.g. phosphorylation) et des interactions moléculaires (protéine-protéine, protéine-ion). L'intégration en décisions cellulaires des multiples flux intracellulaires ou des signatures moléculaires reste des mécanismes mal connus.

Les cellules germinales et les embryons d'amphibien constituent des modèles de choix dans l'étude des mécanismes fondamentaux de la prolifération, de la migration et de la différenciation cellulaire.

L'objectif général de nos procédures vise la compréhension des comportements cellulaires en réponse aux modulations des voies de signalisation intracellulaire. La modulation de ces réseaux moléculaires repose sur des modifications post-traductionnelles (e.g. phosphorylation, nitrosylation, sulfhydratation, sialylation, O-GlcNAcylation) et des interactions moléculaires (protéine-protéine, protéine-ion). La dérégulation de ces voies de signalisation est impliquée dans de nombreuses pathologies sévères.

L'espèce choisie est *Xenopus laevis*, qui constitue un modèle largement caractérisé et établi pour l'étude des événements du développement embryonnaire depuis près d'un siècle grâce à la grande taille des cellules, leur facilité de manipulation et leur disponibilité tout au long de l'année. Les ovocytes, des œufs et les embryons de ces espèces offrent de nombreux avantages développement externe, fortes concentrations de protéines (1 ovocyte = 50 000 cellules somatiques), synchronisation physiologique, fortes capacités de synthèse protéique et forte conservation des mécanismes moléculaires de contrôle du cycle cellulaire. Ce modèle animal s'impose également comme un modèle de choix dans les approches de criblage pharmacologique ou toxicologiques. Ce protocole implique 230 animaux.

Nos procédures impliquent (1) - le prélèvement des ovaires [Ovocytes et œufs de Xénope sont des cellules naturellement synchronisées en G2/M ou en métaphase du cycle cellulaire modèle d'expression hétérologue dans un environnement contrôlé pour des questions biologiques concernant la parasitologie (*Schistosoma*, *Plasmodium*), les neuropathies (Maladie de Parkinson, tauopathies) ou le cancer] (2) - la manipulation d'embryons [embryons de Xénope, âge inférieur à - fécondation externe - modèle dont le développement est caractérisé].

Les thèmes suivants sont abordés au cours de la période demandée 1 - Rôle de la O-GlcNAc dans le développement embryonnaire 2 - Rôle de la Sulfhydratation et de la nitrosylation au cours de la gamétogenèse et de l'embryogenèse précoce modifications post-traductionnelles originales, impliquées dans les fonctions de reproduction, mais dont les effets restent à caractériser. 3 - Approches environnementales des effets de polluants et de contaminants (composés chimiques, herbicide, éléments traces métalliques).

Ce modèle "alternatif" aux mammifères permet de raffiner les expérimentations qui pourront être faites sur des modèles de vertébrés inférieurs, et réduire ainsi le nombre de vertébrés supérieurs utilisés à des fins d'expérimentation animale. Les résultats obtenus dans ces modèles sont transposables chez les mammifères, dans la mesure où les mécanismes étudiés sont hautement conservés au cours de l'évolution. L'utilisation des amphibiens s'inscrit dans une démarche visant à diminuer le nombre de mammifères impliqués en expérimentation animale, et à diminuer le nombre d'animaux utilisés puisque les ovaires se régénèrent chez cette espèce.

15020 De récents travaux épidémiologiques suggèrent un risque accru de cancer associé à la consommation d'aliments ultra-transformés. Les additifs constituent une des hypothèses pour expliquer ces résultats, les travaux expérimentaux récents dans des modèles animaux ayant identifié un potentiel danger de promotion de la carcinogenèse colorectale avec le E171. Si les teneurs maximales autorisées, établies principalement à partir d'études toxicologiques in-vitro/in-vivo, protègent en théorie des potentiels effets nocifs de chaque additif, les conséquences d'un apport cumulé et de potentiels effets cocktails restent très incertaines. Le projet décrit dans cette saisine vise donc à évaluer l'effet de cocktail d'additifs (5 mélanges définis par l'épidémiologie) sur la carcinogenèse colorectale au stade précoce, sur la muqueuse intestinale et sur les bactéries du côlon en tenant compte pour un des 5 clusters de l'effet du régime (exposition via eau de boisson ou alimentation). Nous proposons une expérimentation nutritionnelle de 100 jours chez 84 rats mâles sensibilisés à la carcinogenèse pour évaluer l'effet sur le développement de la carcinogenèse colorectale, l'inflammation et les bactéries coliques (procédure 1) avec un dénombrement post-mortem des lésions précoces dites prénéoplasiques et une expérimentation nutritionnelle de 100 jours chez 84 rats mâles F344 conventionnels pour évaluer l'effet sur l'apparition du cancer, l'impact sur la muqueuse intestinale et le passage de bactéries (procédure 2). Pour ces deux procédures, 7 groupes seront constitués afin de suivre les modulations de l'inflammation de la muqueuse colique, la composition des bactéries coliques et le dénombrement des lésions précancéreuses coliques

dans la procédure 1 (12 rats par groupe) et l'apparition des lésions et l'impact sur la muqueuse intestinale dans la procédure 2 (12 rats par groupe), soit au total 168 rats. Cette expérimentation sans prélèvement sur les animaux hors fèces et urines sera conduite pour réduire au maximum le nombre des animaux tout en maintenant une puissance statistique suffisante, les conditions expérimentales (suivi de la carcinogenèse au stade prénéoplasique ne provoquant pas de douleur, point limites et critères d'interruption (suivi du poids et du comportement en particulier) et injection avec une solution préalablement tamponnée dans la procédure 1 et gavage unique avec sonde à bout arrondi en procédure 2) minimiseront la douleur animale. Les rats seront hébergés dans des locaux d'animalerie conventionnels, leur assurant les meilleures conditions de vie possible et de bien-être avec un hébergement enrichi (utilisation de nids) et collectif (2 rats par cages) en dehors d'un court passage (3 jours maximum) en cages individuelles de façon à récupérer urines et fèces. L'utilisation d'un modèle animal est indispensable car nous travaillons au niveau du côlon où le microbiote joue un rôle très important dans le développement de la carcinogenèse colorectale.

15021 Contexte Les cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC) sont des cancers rapidement et fréquemment métastatiques. Or, la survenue de ces métastases cérébrales assombrit davantage le pronostic des patients atteints de CBNPC. Identifier les protéines impliquées dans la formation de ces métastases cérébrales d'origine pulmonaire pourrait permettre d'améliorer la survie de ces patients.

Projet Certaines anomalies moléculaires acquises par la tumeur bronchique favorisent le processus métastatique de cette dernière. Parmi ces anomalies, l'incidence de l'altération de la voie RASSF1A/Hippo dans les cellules de CBNPC sur leur capacité à former des métastases cérébrales n'a pas encore été évaluée. Nous savons que l'activité de la kinase NDR2, membre de la voie Hippo, est dérégulée au cours de la carcinogenèse bronchique, et qu'elle est à l'origine de l'acquisition d'un phénotype migratoire par les cellules tumorales bronchiques. Les cellules bronchiques ayant une suractivité de la kinase NDR2 sont davantage capables de former des xénogreffes chez la souris SCID beige (formation plus précoce et croissance de la xénogreffe plus rapide). Nous souhaitons dorénavant déterminer si cette activité dérégulée de NDR2 dans les cellules tumorales bronchiques permet à ces dernières de former des métastases et notamment des métastases cérébrales, en étudiant les conséquences de l'inactivation de cette kinase sur la formation et la croissance de métastases de cellules de lignées tumorales bronchiques humaines chez des souris immunodéprimées.

Justification du recours à un modèle animal/nombre d'animaux Le remplacement du modèle animal n'est pas possible. En effet, la tumeur se développant au sein d'un environnement complexe, les méthodes de substitution trouvent leur limite et la validation formelle sur animaux est nécessaire. Pour cette étude, 90 animaux seront nécessaires.

Le nombre de 10 animaux par groupe a été ramené au strict minimum et calculé sur la base d'une analyse de puissance basée sur notre expertise des modèles tumoraux de métastases cérébrales afin d'escompter obtenir des résultats significatifs. De plus, l'utilisation de l'IRM qui permet de suivre l'évolution du volume tumoral sur un même animal permet de réduire au maximum le nombre d'animaux.

Bien-être animal Cette étude basée sur l'expérimentation animale prend en compte le bien-être animal et les pratiques éthiques, et répond à la règle des 3 R (remplacer, réduire, raffiner). Les principes éthiques et les standards de raffinement seront utilisés de la naissance à la mort de l'animal l'intégrité physique de chaque animal sera suivie quotidiennement les jours ouvrés, les weekends et jours fériés par du personnel formé, et ce, afin de détecter tout point critique à la poursuite de l'expérimentation à savoir si l'animal ne s'alimente plus ou est en état de prostration (diminution importante et prolongée de l'activité motrice), s'il présente une perte de poids excessive (15%), si l'animal présente une baisse de la température corporelle, s'il émet des vocalises et/ou s'il convulse, et enfin si la métastase excède un volume cumulé > 50 mm³ et devient alors un frein à sa qualité de vie. Les animaux seront hébergés dans des cages ventilées individuellement et répondant aux normes européennes en groupes sociaux (5 animaux par cage) et bénéficieront d'un enrichissement avec la présence d'igloo.

15022 Les équipages des missions spatiales habitées font état de perturbations des fonctions cérébrales. Dans le cadre des projets d'explorations humaines de l'espace, il est nécessaire de mieux comprendre les altérations du fonctionnement cérébrales sur des modèles animaux de façon à pouvoir proposer des méthodes pour limiter les effets du vol spatial. Les modèles animaux sont indispensables pour connaître les modifications cellulaires et moléculaires au sein du tissu cérébral qui sont induites par la modification de l'environnement gravitaire. L'exposition au vol spatial étant très onéreuse et peu facile à mettre en œuvre, la recherche a développé des modèles de microgravité simulée. Un de ces modèles est la suspension par le train postérieur qui reproduit chez le rat les déconditionnement cardiovasculaire, perte osseuse et fonte musculaire observés chez les spationautes. Ce protocole est admis par l'ensemble de la communauté scientifique. L'animal est maintenu par un harnais attaché à la queue qui permet d'obtenir un angle de 45° du corps par rapport au sol de la cage, le protocole de suspension pouvant durer 28 jours maximum. Un système de poulie permettant le déplacement de l'animal dans cage en marchant sur ces pattes avant. Il dispose d'eau de boisson en permanence et sa nourriture est donnée quotidiennement. Le bien-être de l'animal est suivi quotidiennement dans ce dispositif via l'enregistrement de divers paramètres physiologiques caractéristiques de la bonne santé de l'animal (température, posture, consommation d'eau et de nourriture, poids, glycémie, stress, pelage, fiche de score du bien-être animal,) durant la totalité de l'exposition à la suspension. La validation de ce protocole de suspension a fait l'objet d'une saisine précédente (APAFIS #23316). Ce projet souhaite investiguer l'hypothèse selon laquelle la simulation de la microgravité pourrait engendrer une altération des processus neuronaux et notamment une modification de la production de nouveaux neurones au sein du cerveau adulte, appelé neurogenèse adulte. Par ailleurs, ce projet investiguera si une activité physique quotidienne pratiquée avant la suspension permet de réduire les effets supposés sur la neurogenèse adulte. Ce projet consistera en l'injection intrapéritonéale des animaux avec un ou deux marqueurs de la neurogenèse adulte qui s'incorpore dans l'ADN des cellules en divisions et qui peuvent être révélées par histologie. Les animaux seront alors placés en microgravité simulée avant ou après les injections puis euthanasiés à différents moments pour étudier l'impact de la microgravité simulée sur les différentes étapes de la neurogenèse adulte. Le rat est l'espèce de choix compte-tenu de la présence d'une neurogenèse adulte abondante et de ses capacités d'apprentissage permettant ainsi une bonne réplicabilité des expériences. Pour l'étude de la neurogenèse adulte, notre projet nécessite des animaux matures âgés de 8-10 semaines minimum. Les effectifs minimaux et maximaux d'animaux par groupe sont basés sur nos expériences antérieurs pour une démonstration convaincante d'un point de vue statistique soit 8-10 animaux par groupe. L'étude débutera sur des rats mâles et en fonction des résultats obtenus, nous généraliserons cette étude en utilisant des femelles. Chaque animal sera utilisé successivement dans toutes les procédures afin de minimiser le nombre d'animaux utilisés dans le souci du respect de la règle des 3R. **REPLACEMENT** la mesure des performances de mémoire ne peut se faire que sur des animaux se comportant et donc il n'est pas possible de remplacer le modèle animal par un autre organisme ou par une lignée cellulaire. **REDUIRE** ce projet vise à réduire considérablement le nombre d'animaux inclus dans ce type d'étude, puisqu'un maximum d'organes sera prélevé pour être mis à disposition de la communauté scientifique s'intéressant aux problématiques de vie dans l'espace (muscle, os, cœur et vaisseaux, foie, plasma et cellules sanguines). Par ailleurs, l'injection de plusieurs marqueurs différents de la neurogenèse adulte chez les mêmes animaux permettra de réduire considérablement le nombre d'animaux utilisés qui par ailleurs correspond au minimum nécessaire pour une démonstration convaincante d'un point de vue statistique. **RAFFINER** La mise en place de la microgravité simulée pouvant être une source de stress, nous avons particulièrement porté notre attention au raffinement des protocoles de façon à assurer aux animaux un minimum de contraintes et un maximum de bien-être. Ce dernier suivi et apprécié, tous les jours, dans une fiche de score (paramètres de stress et de comportement) au cours des expériences (manipulation biquotidienne des animaux, suivis de paramètres physiologiques poids, température, consommation de nourriture et de boisson, activité physique, ...). Ce projet utilisera au maximum 450 animaux sur 2 ans, de sexe mâle et femelle répartis dans les différents groupes expérimentaux. Parmi ces animaux, les animaux contrôles ne seront ni soumis à la suspension, ni à l'exercice physique.

15023 Objectif du projet

La maladie d'Alzheimer (MA) se caractérise par une perte progressive de la mémoire et des fonctions cognitives. Dans les étapes précoces de la MA, on observe le dépôt d'agrégats protéiques appelés plaques amyloïdes. Ces dépôts apparaissent dans une zone du cerveau impliquée dans l'apprentissage et la mémoire, l'hippocampe. Le peptide bêta- amyloïde est le composant principal de ces plaques amyloïdes.

L'apprentissage et la mémoire reposent sur la plasticité des circuits de notre cerveau, c'est-à-dire la capacité des neurones à modifier de façon durable l'efficacité de leur transmission synaptique. La toxicité du peptide bêta-amyloïde affecterait la transmission synaptique et ainsi diminuerait la communication entre neurones, entraînant une détérioration précoce et irréversible de la mémoire.

Dans ce projet, nous proposons d'étudier dans des modèles induits de la maladie d'Alzheimer (injection dans l'hippocampe du peptide bêta-amyloïde) l'effet de la prise orale d'un complément alimentaire (par gavage) chez le rongeur sur

-la plasticité des réseaux neuronaux qui sous-tend les troubles d'apprentissage et de mémoire.

-une tâche comportementale passive d'apprentissage et de mémoire qui fait appel à l'hippocampe (reconnaissance d'objets nouveaux).

Ce projet, d'une durée de 2 ans, nécessitera 240 rongeurs (120 rats et 120 souris).

Avantages

Le modèle d'injection intracérébrale du peptide bêta-amyloïde est couramment utilisé dans les études scientifiques afin d'induire des déficits cognitifs et électrophysiologiques caractéristiques de la MA chez des animaux sains. Ce modèle d'étude consiste en une injection par stéréotaxie directement dans l'hippocampe. Cette injection va induire des déficits cognitifs et électrophysiologiques et ainsi mimer les symptômes de la MA, en accélérant le processus naturel de vieillissement cognitif chez le rongeur. Les signaux électrophysiologiques seront enregistrés grâce à des électrodes placées dans l'hippocampe au cours de la même chirurgie stéréotaxique que l'injection du peptide.

Ce projet scientifique associé à notre plateforme d'électrophysiologie *in vivo* (sur animal vigile) et de comportement permettra de mettre en évidence l'efficacité d'un complément alimentaire, dont l'innocuité a été testée au préalable, sur les modifications du réseau neuronal sur un modèle animal de la MA. L'électrophysiologie est une technique très puissante qui permet l'enregistrement de la plasticité des réseaux neuronaux.

Domages escomptés

L'injection du peptide devrait entraîner des déficits mnésiques mais pas d'altération de l'état général de l'animal. L'état général et le bien-être de l'animal seront attentivement suivis durant toute la durée du projet.

Suite à l'injection stéréotaxique du peptide bêta-amyloïde et au placement des électrodes, les animaux peuvent présenter des signes de douleur malgré les précautions (asepsie, analgésiques, anesthésiques) prises pré, per et post chirurgie.

Dans tous les cas, des fiches d'observation / points limites préalablement définis et adaptés permettront d'assurer un suivi de l'état général et du bien-être des animaux et de mettre en place des interventions précoces et des procédures de prise en charge en cas de besoin.

Méthodes alternatives (principe de remplacement)

Aucun milieu de culture ou système synthétique ne peut aujourd'hui reproduire la complexité architecturale des cellules du cerveau, et en particulier leurs interactions structurelles et fonctionnelles. En ce sens, seules des approches menées chez un modèle animal, certes simplifiées, peuvent améliorer la connaissance du cerveau humain et son développement, et ainsi aboutir au développement de nouvelles thérapies pour des pathologies neurodégénératives. Nos expérimentations seront réalisées chez le rat et la souris; ces rongeurs, de petite taille et d'élevage facile, possèdent un système nerveux dont le développement est extrêmement proche de celui du système nerveux humain, et dont l'organisation, certes simplifiée, est suffisamment complexe.

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

-réduction le nombre de rongeurs utilisé a été réduit autant que possible, tout en étant suffisant pour l'obtention de résultats exploitables. Sur un même animal, nous pourrions enregistrer simultanément différents paramètres électrophysiologiques et les performances dans une tâche comportementale. L'évaluation du nombre d'animaux nécessaire a été effectuée par l'utilisation du programme GPower 3.1. Les résultats seront analysés avec le logiciel GraphPad Prism. Nous adapterons les tests statistiques en fonction de la distribution des observables, qu'elle soit normale ou non.

-raffinement dès leur arrivée, et pendant à minima 5 jours, les animaux seront hébergés dans des cages collectives avec un environnement enrichi (jouets, copeaux de bois à grignoter, contact visuel et olfactif entre les animaux, musique, commutation progressive de la lumière et interactions fréquentes avec les humains...). Boisson et nourriture seront disponibles ad libitum.

Pendant les étapes pré, per et post chirurgie, plusieurs mesures seront mises en place afin de réduire au maximum la douleur utilisation d'anesthésiques et d'analgésiques, application de gel ophtalmique afin d'éviter le dessèchement de la cornée, maintien d'une température constante par un tapis chauffant.

Après la chirurgie, les animaux seront isolés afin d'éviter tout dommage au niveau des implants ou l'apport de germes susceptibles de provoquer une infection. Afin de limiter le traumatisme lié à l'isolement, les animaux seront placés en cage individuelle à minima 24 heures avant la chirurgie afin de leur permettre de faire leur nid et de laisser leur empreinte olfactive. En cas de signes d'infection, les animaux recevront une antibiothérapie adaptée.

Avant le début des enregistrements électrophysiologiques/comportementaux, une période de récupération post- chirurgicale d'au moins une semaine sera respectée.

Dès la réception des animaux, une observation journalière sera mise en place. Des points limites préalablement définis et adaptés permettront d'assurer un suivi de l'état général des animaux (souffrance, stress, angoisse...) et ainsi de préserver leur bien-être. En cas d'altération de l'état de l'animal, la surveillance sera rapprochée et les animaux seront soignés en fonction de la sévérité de la douleur observée.

15024 Le cancer colorectal est le 3e cancer plus fréquent en France. Il y a peu de traitements proposés et la solution la plus efficace pour éviter la dissémination dans l'organisme est d'enlever la tumeur par chirurgie et de bénéficier de traitements par chimiothérapie associée ou non à un traitement visant à réduire la vascularisation de la tumeur. Il est maintenant établi que le système immunitaire joue un rôle important dans l'efficacité anti-tumorale des chimiothérapies mais il présente un effet nocif direct.

De plus, il a été mis en évidence que différents composés de la flore intestinale (microbiote intestinal) pouvaient avoir un rôle dans la protection et dans le développement du cancer colorectal. De récents travaux publiés chez la souris ont aussi démontré l'importance du microbiote intestinal dans l'efficacité anti-tumorale d'immunothérapie et de chimiothérapies contre le cancer colorectal.

Notre projet vise à utiliser ces informations pour permettre de faire un vaccin contenant des cellules intestinales ou des contenus intestinaux de patients cancer colorectal traités par un agent chimio thérapeutique.

La vaccination avec ces composés pourra permettre de produire une réponse immunitaire et un changement du microbiote intestinal qui permettrait une diminution partielle ou totale de la croissance tumorale.

Nous souhaiterions aussi mettre en évidence le rôle et les mécanismes de différents facteurs dans ces cellules intestinales de la vaccination. Nous utiliserons différents modèles de souris telles que des souris dépourvues de flore microbienne (rôle du microbiote), ou des souris dépourvues de différents récepteurs ou protéines que nous pensons impliqués dans la reconnaissance des cellules vaccinées. Afin de diminuer les facteurs employés nous nous sommes concentrés sur des mécanismes précis.

Par ailleurs, afin de caractériser la composition de la flore intestinale des patients, nous utiliserons aussi le contenu intestinal de ces patients atteints d'un cancer colorectal pour réaliser des vaccinations. Nous étudierons la conséquence de la vaccination sur la croissance de lignée tumorale du cancer. De ce fait nous pourrions identifier les contenus de l'intestin qui permettent un ralentissement de croissance tumorale (répondeur) et ceux qui accélèrent ou n'ont aucun effets (non répondeur). Nous tenterons d'identifier les bactéries et les cellules des contenus intestinaux des patients susceptibles d'activer le système immunitaire anti-tumoral de ces prélèvements de patients (bactéries bénéfiques). L'identification de ces bactéries nous permettrait de concevoir des traitements pré/probiotique afin de changer le microbiote des patients pour leur permettre de diminuer ou de mieux réagir aux traitements chimiothérapeutiques.

Ces résultats devraient permettre de sélectionner les patients pouvant bénéficier d'une transplantation fécale (avec des bactéries bénéfiques) afin de permettre d'améliorer la réponse aux traitements de chimiothérapies.

Dans le cadre de ce projet de recherche, nous utiliserons le modèle animal, la souris, car nous étudions la réponse à la vaccination c'est à dire la réponse immunitaire et la mémoire immunitaire et il n'y a que dans les modèles animaux (qui miment bien le système de l'Homme) que nous pourrions voir cela. En effet, du fait de sa complexité, il est actuellement impossible de reconstituer un système immunitaire hors d'un organisme vivant. L'étude sur animaux est essentielle car c'est le seul modèle qui permet l'étude concomitante du système immunitaire, de la flore et l'évolution pathologique, la culture *in vitro* ne présente pas ces avantages mais nous a permis de sélectionner le vaccin à utiliser. Par ailleurs, le modèle de tumeur utilisé dans ce projet a été développé uniquement chez la souris et est indispensable à l'étude de l'immunité anti-tumorale dans le contexte du même hôte.

Ce projet se déroulera sur plusieurs années et nécessitera plusieurs expérimentateurs. Le projet durera 5 ans et nécessitera 3607 souris. Ce nombre important d'animaux se justifie par les différentes combinaisons thérapeutiques, l'étendue de la diversité de la flore intestinale ainsi que les différentes voies de signalisation étudiées.

Les procédures expérimentales mises en jeu respecteront les exigences de remplacement, réduction et raffinement. D'une part, nous avons minimisé les animaux utilisés en faisant des expériences préliminaires pour valider les cellules utilisées. D'autre part, les groupes seront constitués d'un minimum d'animaux assurant la fiabilité des résultats en termes de statistiques. Le nombre de prélèvements pré- et post-mortem seront optimisés afin d'étudier le plus de paramètres possibles et ainsi d'éviter la répétition d'expérimentation. Enfin, les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux. Ainsi, un anesthésique local sera appliqué à chaque injection. Par ailleurs, les souris seront observées quotidiennement pour être soignées dès le moindre problème de santé.

15025 L'Amphotéricine B fait partie de la liste des médicaments essentiels de l'Organisation mondiale de la santé.

C'est une molécule aux propriétés antifongiques indiquée dans le traitement des mycoses mais c'est également le traitement de première intention pour la leishmaniose viscérale qui est une maladie parasitaire dont la forme viscérale, la plus grave, atteint les organes vitaux et est mortelle en l'absence de traitement. C'est le parasite qui cause le plus de mort après le paludisme.

L'Amphotéricine B est administré par voie intraveineuse car elle a une très faible biodisponibilité orale. Elle ne passe pas la barrière intestinale ni dans ses formulations classiques ni sous sa forme liposomale (AmBisome®). Mais la voie intraveineuse n'est pas adaptée au pays en voie de développement. C'est pourquoi le développement d'une formulation de prix modéré et administrable par voie orale est un enjeu de santé publique car elle serait accessible aux malades dans ces pays où la leishmaniose viscérale est endémique.

L'objectif de ce projet est de déterminer si une nouvelle formulation nanoparticulaire lipidique, dénommée nanocochléates, permettrait d'améliorer la biodisponibilité orale de l'Amphotéricine B.

Des études ont montré que cette formulation est capable de promouvoir l'activité de l'Amphotéricine B contre les maladies infectieuses après administration orale.

Par contre, aucune étude n'a été publiée sur la pharmacocinétique de cette formulation d'Amphotéricine B. Or, cette information serait essentielle pour comprendre le potentiel des nanocochléates en tant que systèmes d'administration orale des molécules peu solubles.

La pharmacocinétique et la biodistribution de nanomédicaments *in vivo* sont le résultat d'interactions très complexes entre le nanomédicament et les différents milieux et barrières biologiques qu'ils traversent (ici, milieu gastrique et intestinal). Après administration par la voie orale, le médicament va rejoindre la circulation sanguine au travers de la barrière gastro-intestinale. Pour cela, il est transporté via la veine porte vers un premier passage obligé par le foie où il va être en partie transformé voire éliminé avant d'atteindre la circulation générale. De nombreux médicaments sont dégradés lors de ce premier passage hépatique. Il est donc nécessaire de mener ces études sur des animaux vivants pour reproduire tous ces processus et évaluer la biodisponibilité du principe actif.

La pharmacocinétique se fera sur des rats qui du fait de leur taille permettront de réaliser des prélèvements multiples de sang et ainsi réduire le nombre d'animaux utilisés. Les nanocochléates, sous forme de poudre, seront administrés dans des gélules à l'aide d'une canule appropriée.

Le dimensionnement des groupes expérimentaux a été réalisé à l'aide d'un logiciel permettant une planification statistique minutieuse qui permettra l'utilisation d'un nombre minimum d'animaux tout en préservant la validité statistique de l'étude. 64 rats sont prévus pour cette étude.

Le bien-être des animaux (raffinement) est également respecté. Les conditions d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance ou angoisse que pourraient ressentir les animaux. Des méthodes d'anesthésie sûres et efficaces seront utilisées pour exécuter toute intervention douloureuse.

15026 L'immunosénescence définie comme l'altération de la réponse immunitaire dans sa globalité en raison du vieillissement devient un sujet d'étude grandissant avec l'augmentation du nombre de personnes âgées au sein de la société. L'une des questions majeures posées dans ces nombreuses études est l'efficacité des produits de vaccination chez ces personnes âgées et comment optimiser leur efficacité.

Des candidats vaccins visant les cancers ou les maladies infectieuses chroniques sont actuellement développés. Les populations affectées par ces pathologies sont majoritairement âgées et le laboratoire souhaite évaluer l'impact de l'âge sur l'immunogénicité de ses candidats vaccins et la possibilité d'optimiser celle-ci en les combinant avec des produits d'immunostimulation de type *host directed therapy* (ou HDT). Pour cela, dans un premier temps, l'immunogénicité d'un candidat vaccin pour une pathologie infectieuse chronique, décrit comme étant immunogénique, va être évaluée chez des souris âgées et comparée à l'immunogénicité du même candidat chez des souris jeunes. Si la réponse immunitaire induite par le candidat vaccin s'avère plus faible/altérée dans les souris âgées, alors dans un deuxième temps, nous étudierons la possibilité d'optimiser l'immunogénicité et la réponse immunitaire induite en co-administrant avec le candidat vaccin un traitement immunostimulant de type HDT chez des souris âgées. Si la réponse immunitaire induite par le candidat vaccin thérapeutique n'est pas altérée, un autre vaccin, préventif, sera testé de la même façon. Si la réponse induite par celui-ci est altérée chez les souris âgées, une 2ème phase consistera à optimiser son immunogénicité par une co-administration d'un traitement immunostimulant.

Bien que le modèle murin ne reproduise pas toute la complexité des mécanismes immunitaires chez l'homme, il reste néanmoins une bonne alternative et un modèle reconnu pour l'étude de l'immunosénescence. Les altérations du système immunitaire liées à l'âge sont décrites dans le modèle murin et le nombre de tests disponibles pour évaluer la réponse immunitaire permet de faire des études complètes.

A l'heure actuelle, aucun modèle *in vitro* ne peut se substituer au modèle murin pour l'étude décrite ici. Les conditions d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées seront appliquées pour

respecter le bien-être de l'animal et limiter au maximum la souffrance subie par l'animal (définition de points limites). Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet sera réduit au minimum sans compromettre les objectifs de ce dernier.

Ce projet inclura au maximum 190 souris.

15027 Le phénomène de latéralisation cérébrale a été pour la première fois décrit chez l'humain, par des médecins ayant constaté des défauts du langage chez des patients ayant subi des lésions unilatérales du cerveau. Au milieu du XIX^{ème} siècle, Paul Broca et Marc Dax ont alors découvert les régions du cerveau spécialisées dans la formation et la compréhension du langage, situées chez la majorité des individus dans l'hémisphère gauche. La question du rôle de cette latéralisation a alors soulevé de nombreuses interrogations. Quels sont les avantages évolutifs offerts par un traitement latéralisé des informations ? On suppose que le fait de spécialiser un hémisphère dans un type de tâche spécifique permettrait d'allouer la région correspondante de l'autre hémisphère à une tâche de nature différente. Cependant, les preuves permettant de confirmer ou non cette hypothèse demeurent trop peu nombreuses et méritent des investigations plus poussées. Initialement découverte chez l'humain, la latéralisation a longtemps été considérée comme une spécificité humaine, ayant permis le développement de capacités cognitives complexes telles que le langage. Depuis, de nombreuses observations de latéralisation ont été faites dans des espèces variées, tant chez des vertébrés (poussin, poisson zèbre, chien) que chez des non-vertébrés (drosophile, abeille, etc.). Malgré toutes ces études, les bases neurales de cette latéralisation, son évolution au cours du développement de l'individu ainsi que le rôle de l'environnement précoce sur sa mise en place demeurent complètement méconnus. Par ailleurs, dans un souci de facilitation des expérimentations et du traitement des données, la très grande majorité des études ne s'est pas intéressée au rôle du genre sur la latéralisation et a réalisé l'ensemble des observations sur des individus d'un même sexe, majoritairement mâle.

Nous souhaitons étudier ces différentes questions dans une modalité sensorielle largement étudiée chez la souris, l'olfaction. Nous souhaitons d'abord étudier la présence d'une latéralisation du traitement de l'odeur chez l'animal adulte, en comparant différents types d'odeurs (biologique ou non) et en étudiant l'effet de l'apprentissage sur cette latéralisation. Par ailleurs, nous souhaitons évaluer la mise en place au cours du développement des processus de latéralisation en exposant les souris mâles et femelles à des environnements olfactifs différents de leur naissance jusqu'à leur sevrage. Pour cela, les animaux dans une première procédure seront exposés à des odeurs biologiques (urine, prédateur). Dans une seconde procédure, les animaux seront élevés dans un environnement enrichi en odeurs de la naissance au sevrage. Les capacités olfactives des animaux seront évaluées par des observations comportementales non invasives immédiatement après le sevrage et chez des animaux devenus adultes. Les animaux seront ensuite mis à mort et les neurones ayant été activés par les odeurs pourront être mis en évidence sur coupes histologiques. Ainsi, nous pourrions caractériser l'impact de l'environnement précoce sur le développement de la latéralisation du traitement cérébral de l'odeur et ses effets à long terme chez l'adulte. Nous pourrions également comparer les réseaux mis en place chez les individus mâles et femelles dans les différentes conditions et étudier ainsi les éventuelles différences de réseaux liées au genre considéré.

D'un point de vue fondamental, ces résultats apporteront des informations précieuses concernant le traitement latéralisé de l'information olfactive et les mécanismes permettant sa mise en place dans le système olfactif chez la souris. Nous aurons également plus largement accès à des éléments clés du rôle de l'environnement précoce, du genre et de leur interaction sur le développement du système nerveux impliqué dans l'olfaction. D'un point de vue clinique, ces données pourront contribuer à une meilleure compréhension de pathologies neuro-développementales comme les troubles du spectre autistique dans lesquels une altération de la latéralisation cérébrale a été évoquée ou encore dans la compréhension des déficits associés aux lésions cérébrales unilatérales.

L'étude des processus physiologiques et plus particulièrement l'étude des bases neurales du comportement et de la latéralisation requiert l'utilisation d'animaux vivants et ne peut s'envisager

sur des modèles strictement *in vitro*. La très grande majorité des études sur les bases neurales de la perception olfactive a été réalisée chez la souris C57Bl6J adulte. C'est pourquoi nous utiliserons le même modèle d'étude, chez le jeune et l'adulte. 255 souris sur une période de 4 ans seront nécessaires à ce projet. Les bases neurales de la perception olfactive et sa latéralisation seront étudiées principalement post mortem aux échelles cellulaire et moléculaire par la révélation et l'analyse quantitative de marqueurs d'activité neuronale. Des expériences comportementales non invasives seront nécessaires pour évaluer l'apprentissage olfactif réalisés par les souris exposées à divers odorants. Nous resterons très attentifs au bien-être animal sachant que les procédures envisagées sont de sévérité légère.

Les dispositions prises pour l'application de la règle des 3R seront les suivantes

- Remplacer les modèles animaux l'étude des bases neurales sous-tendant un comportement nécessite l'utilisation d'un modèle animal. Nous ne sommes pas en mesure de réaliser nos expériences sur un modèle cellulaire qui ne permet pas d'intégrer les observations réalisées jusqu'à l'échelle comportementale des individus.

- Réduire le nombre d'animaux en expérimentation nous avons prévu pour nos expérimentations le nombre nécessaire et suffisant d'animaux pour assurer une puissance statistique satisfaisante dans le traitement de nos résultats. Par ailleurs, pour réduire au maximum le nombre d'animaux nécessaires, nous corrélons, grâce à des outils statistiques adaptés, les résultats comportementaux et cellulaires des mêmes animaux et poursuivrons le développement de modèles bio-informatiques visant à diminuer le nombre d'animaux nécessaires aux expérimentations.

- Raffiner les animaux feront l'objet d'une surveillance rapprochée et suivie afin de détecter les points limites de souffrance. Toutes les manipulations le nécessitant seront réalisées sous anesthésie générale et des traitements préventifs (antalgiques) seront utilisés afin de réduire les risques de douleur. Le poids et l'apparence physique des animaux seront vérifiés tout au long de la durée du protocole. Une perte de poids supérieure à 20% ou un signe révélateur de souffrance animale engendrera une mise à mort. Le comportement et la posture des souris seront également observés afin d'évaluer le degré de bien-être ou de douleur des animaux.

15028 L'élevage de volaille peut être réalisé dans des conditions très différentes (litière, densité, vaccination, âge des mères des volailles, contrôle de l'ambiance, etc.). Ces paramètres ont une influence notable sur les performances zootechniques, la qualité de la viande et également sur le bien-être des animaux.

Lorsqu'un éleveur de volaille cultive également du blé sur son exploitation, il est très courant que celui-ci utilise de la paille comme litière. La paille a l'avantage d'être économiquement intéressante mais elle absorbe moins l'humidité que les copeaux de bois, et ainsi la litière des volailles se dégrade plus vite. Une litière dégradée est souvent synonyme de présence de lésions sur les volailles en particulier au niveau des pattes.

De plus, lorsque la densité des animaux est importante, la litière se dégradera plus rapidement.

Il est possible de limiter la dégradation des litières, en partie par l'alimentation des volailles. En effet, plus un aliment sera proche des besoins nutritionnels des animaux, mieux il sera valorisé et moins il y aura de rejet.

Les besoins nutritionnels des volailles évoluent en fonction des souches, de l'âge des mères des volailles à la naissance ou encore du statut immunitaire des animaux. Ainsi, il est essentiel de réaliser des essais zootechniques, d'une durée maximale de 77j, dans des conditions particulières d'élevage (densité de maximum 19 animaux/m², litière paille, animaux issus de jeunes mères reproductrices) afin de proposer par la suite des solutions nutritionnelles adaptées aux animaux et permettant de maintenir leur bien-être et leur croissance pour tous types d'élevage.

Ce projet, d'une durée de 5 ans, emploiera un nombre maximal de 70 500 animaux (poulets + dindons) : 10 essais x 5 groupes en moyenne x 6 répétitions x 47 animaux maximum par parquet x 5 ans). Le nombre de groupes et de répétitions est choisi pour chaque essai en fonction des

solutions nutritionnelles testées. L'objectif est de réduire le plus possible le nombre d'animaux tout en s'assurant qu'il soit suffisant pour les analyses statistiques et mettre en évidence des différences. Les expérimentations ont été conçues en respectant la règle des 3R :

- Remplacer Lorsque c'est possible, les solutions nutritionnelles sont préalablement testées par des méthodes *in vitro* afin de sélectionner uniquement les plus prometteuse pour les essais *in vivo*. Cependant, ces méthodes de laboratoire ne permettent pas d'appréhender les variations inter-individuelles, l'effet des souches ou encore de l'environnement.

- Réduire le nombre d'animaux est réduit à son minimum tout en ayant assez de répétitions pour maintenir des plus petites différences significatives de 5%. De plus, les protocoles d'expérimentations utilisés sont normalisés afin que les résultats soient intégrés dans des bases de données pour réaliser des méta-analyses et valoriser un maximum les résultats de ces expérimentations. Également dans un objectif de réduction, les essais peuvent être communs à plusieurs entreprises concurrentes sur le marché.

Raffiner Les animaux sont élevés comme en élevage avec en plus une attention particulière du suivi des animaux (passage d'animalier 2 à 3 fois/jour), du contrôle de l'ambiance (température, ventilation et repaillage régulier) et en limitant leur stress et la manipulation des animaux

15029 Toute lésion de l'organisme quelle qu'en soit l'origine s'accompagne d'une réaction de défense non spécifique : l'inflammation. Au cours de l'inflammation, une hypersensibilité à la douleur se développe. Cette hypersensibilité conduit souvent à la chronicisation de la douleur qui peut être très handicapante. Il existe d'une part une sensibilisation périphérique (augmentation de la réponse des récepteurs périphériques des neurones), d'autre part une sensibilisation centrale (augmentation de la réponse des neurones de la moelle épinière, entraînant un phénomène de mémorisation de la douleur).

Après une stimulation douloureuse, les voies de signalisation intracellulaire qui contrôlent l'inflammation, celle des cytokines et celle des voies de signalisation contribuent à cette sensibilisation. En particulier, le TNF (Tumor necrose factor) et la kinase p38 (p38 MAPK) jouent un rôle très important dans l'hypersensibilisation douloureuse développée au cours de l'inflammation. Celle-ci participe à une cascade contrôlant les réponses cellulaires au stress, et régule au même temps la production et l'activité des médiateurs pro-inflammatoires. Des inhibiteurs de cette kinase p38 sont en cours d'évaluation avec des applications dans plusieurs pathologies, y compris celles qui sont caractérisées par la douleur inflammatoire chronique. Ainsi, l'efficacité de plusieurs inhibiteurs de la p38 MAPK a été démontrée dans des modèles précliniques de douleur neuropathique. De même, des inhibiteurs du TNF pourraient atténuer ces phénomènes de chronicisation.

Nous avons choisi d'étudier la pertinence, d'une part de l'inhibition de la MAPK p38 et de l'autre de l'inhibition du TNF pour le contrôle de la douleur périphérique et/ou viscérale. Pour cela, nous nous proposons d'étudier l'effet d'un inhibiteur puissant et sélectif de la p38 MAPK, et d'un inhibiteur du TNF. La première molécule est actuellement en cours d'évaluation clinique chez des patients présentant une dysrégulation vasculaire ou une maladie pulmonaire obstructive chronique. La deuxième est le chef de file d'une série de molécules utilisées en rhumatologie.

Le but du travail envisagé sera de mesurer l'effet de ces molécules sur l'inflammation et la douleur. L'effet sera testé sur un modèle de douleur périphérique et viscérale modérées et transitoires chez le rat. Il n'est pas possible de remplacer l'expérimentation animale dans ce type d'étude, il n'y a pas de méthode alternative possible, mais le stimulus utilisé (carragénine, sucre d'origine naturelle entrant dans la composition de nombreux aliments en particulier lactés ne provoque pas de douleur au repos, seulement une hyperalgésie et une allodynie transitoires à la stimulation (raffinement). Des rats mâles adultes Sprague Dawley provenant d'un élevage agréé seront utilisés pour tester les effets antinociceptifs du médicament. Les rats sont acclimatés pendant 10 jours avec le même expérimentateur avec prise en main, caresses, installation 30 minutes sur une plateforme grillagée une fois par jour. Si les résultats sont positifs, nous étudierons l'effet sur l'apparition des cytokines pro-inflammatoires et les MAP kinases. La réduction du nombre d'animaux nécessaire fera

intervenir une analyse statistique optimale après un calcul de puissance. Nous avons estimé le nombre d'animaux nécessaires à 944 au maximum (tout est efficace).

15030 Le déficit en enzyme (=protéine) lipase acide lysosomale (LAL) est une maladie génétique autosomale récessive causée par des mutations dans le gène LIPA. Elle induit une accumulation de gras (=lipides) au niveau des organes, notamment dans le foie. La gravité de l'affection dépend de la quantité d'enzymes. La forme la plus sévère de la maladie (maladie de Wolman), absence totale de l'enzyme (<2% d'enzymes), concerne 1 nourrisson sur 300 000 naissances et entraîne une mort précoce à l'âge de 3-8 mois, tandis que dans sa forme la moins sévère (maladie du stockage des esters de cholestérol, CESD), les patients ne présentent peu de symptômes visibles. La transplantation de cellules souches du sang d'un donneur sain peut être bénéfique. Les cellules souches saines greffées dans la moelle osseuse remplacent toutes les cellules sanguines et immunitaires du patient. En circulant dans le sang, les cellules saines produisent et libèrent l'enzyme LAL normale, et donc amène une enzyme fonctionnelle vers les organes affectés afin de rétablir leur fonction normale. Le manque de donneur compatible et le risque de rejet de greffe (réaction immunitaire du patient dirigée vers les cellules du donneur) limitent le recours à cette procédure. Un traitement basé sur une injection hebdomadaire de l'enzyme LAL dans le système sanguin a été récemment approuvé. Son efficacité à long terme est encore en cours d'évaluation. Des premiers éléments suggèrent une diminution de l'efficacité au cours du temps chez les patients probablement dus une réponse immune contre la molécule. De plus, ce traitement nécessite des réinjections tout au long de la vie du patient et reste couteux.

Nous souhaitons développer un traitement curatif à long terme de la maladie ne nécessitant qu'une injection. Pour cela, notre projet consiste à ajouter un gène LIPA normal dans les cellules souches de patient. Les cellules corrigées seront administrées dans la circulation sanguine, atteindront et se multiplieront au niveau de la moelle osseuse afin de produire de nouvelles cellules corrigées dans le sang. Ces cellules vont produire et libérer dans la circulation l'enzyme LAL, qui atteindra et traitera les organes cibles affectés (foie, intestin...). Cette méthode permettrait de guérir le patient en une seule injection, sans risque de rejet.

Plusieurs vecteurs de thérapie génique ont été construits et produits pour exprimer l'enzyme LAL dans des globules rouges et la sécréter dans le sang. La stratégie expérimentale a été testée sur des cellules souches humaines et des cellules de peau de patient afin d'assurer la production et la sécrétion de l'enzyme. Néanmoins, ce système *in vitro* est limité puisqu'il ne permet pas de reproduire complètement la différenciation des cellules souches en différents types de cellules sanguines. De plus, la maladie de Wolman affecte différents organes et donc nécessite d'étudier l'effet thérapeutique biodistribution de l'enzyme et diminution du taux de lipides sur un organisme animal.

Pour ce projet, nous avons généré une lignée de souris LAL déficiente, et souhaitons dans un premier temps étudier leurs caractéristiques évolution dans le temps du poids de l'animal, de l'accumulation de lipides au niveau des organes (foie, rate, intestin ...), et de biomarqueurs sanguins de la pathologie. Pour étudier la correction des symptômes, les cellules souches de souris LAL déficientes seront récupérées, corrigées et transplantées dans des souris LAL déficientes afin de rétablir la production de l'enzyme déficiente. Les cellules transplantées ne créeront pas de dommages supplémentaires, car elles seront amenées soit à mourir, donc n'induire aucun effet, soit à se greffer dans la moelle osseuse où elles pourront avoir un effet thérapeutique réduire les lipides accumulés au niveau tissulaire.

Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés pour ce projet, l'efficacité de 7 vecteurs utilisés pour corriger le défaut génétique a été comparé *in vitro* sur des cellules souches du sang humain. Les 4 meilleures constructions seront utilisées pour les études *in vivo*, ce qui a permis de réduire le nombre d'animaux utilisé 24 souris en moins (3 vecteurs initiaux en mois, 8 souris par groupe).

Les procédures expérimentales potentiellement douloureuses (prélèvement sanguin et injection des cellules corrigées) seront effectuées sous anesthésie gazeuse (Isoflurane).

Le nombre de souris nécessaire a été estimé à 9 souris par groupe, par une étude statistique prédictive (test de comparaison quantitative de groupes). Les souris seront élevées et reproduites dans notre établissement utilisateur. Notre projet durera 5 ans et nécessitera l'utilisation totale de 345 souris (129 souris sacrifiées pour récupérer les cellules souches et 216 souris utilisées dans les procédures expérimentales).

15031 Rationnel La période périnatale qui s'étend de la grossesse (in utero) jusqu'à la fin des 2 ans de l'enfant est une période critique pouvant avoir d'importance conséquence sur la santé à l'âge adulte. La manière dont l'enfant naît (césarienne, voie naturelle), son alimentation (lait maternel, lait maternisé...), son environnement, sont autant de facteurs pouvant impacter sur la colonisation microbienne du nouveau-né et avoir un impact important sur la composition de son microbiote, c'est-à-dire l'ensemble des microorganismes qu'il héberge, principalement au niveau intestinal. Le microbiote intestinal est actuellement reconnu comme un élément clé de notre santé et son déséquilibre peut conduire à de nombreuses pathologies. La primo-colonisation du tube digestif est donc une étape cruciale pouvant conditionner notre santé à l'âge adulte.

Objectifs Notre projet vise à étudier l'impact de la colonisation périnatale de nouveau-nés par des prébiotiques, ingrédients capables d'influencer positivement la composition du microbiote, de probiotiques, bactéries présentant des propriétés bénéfiques pour l'hôte (principalement bifidobactéries et lactobacilles) mais également de bactéries commensales isolées du microbiote de nouveaux-nés ou de composants bactériens dérivés. Les femelles gestantes seront traitées quelques jours avant la mise bas ainsi que les souriceaux nouveaux-nés pendant les premiers jours de vie. Seules les souches ayant préalablement été démontrées *in vitro* comme possédant des propriétés fonctionnelles intéressantes et ayant également conduit à des capacités bénéfiques *in vivo* chez les souris adultes seront évaluées dans ce modèle ('Réduction'). Par ailleurs, notre étude vise à élucider l'impact de la primo-colonisation sur 1) la maturation de la barrière intestinale et du système immunitaire et 2) sur le développement à l'âge adulte de pathologies chroniques ou infectieuses, processus physiopathologiques mettant en jeu de nombreux tissus et organes ainsi que divers types cellulaires. Ceci impose donc le choix d'approches expérimentales *in vivo* et *ex vivo* chez la souris ('Remplacement').

Modèles Animaux et Méthodologie Des femelles gestantes seront traitées oralement jusqu'à la mise bas et les nouveaux-nés recevront le même traitement de la naissance jusqu'au 8ème jour (Procédure N°1). Nous évaluerons l'impact de cette colonisation précoce sur la composition du microbiote à différents stades de développement ainsi que sur la maturation du système immunitaire après 2 semaines de colonisation. Nous évaluerons notamment l'impact sur l'intégrité de la barrière intestinale (Procédure N°2). Une partie des souriceaux seront maintenus jusqu'au stade adulte après sevrage et seront soumis à différentes expérimentations (modèles d'obésité et/ou de diabète, modèles de colite, ou d'infection (selon des procédures déjà validées). Chaque expérience sera réalisée sur un nombre maximal de 12 souris femelles gestantes pouvant avoir chacune une portée d'environ 6 souris, permettant de les traiter en 4 groupes (3 souris mères et 18 souriceaux par groupe) soit un total maximal de 84 souris par expérience (12 mères, 72 souriceaux). 3 expériences par an sont prévues, soit un total de 1260 animaux sur 5 ans. Les manipulations, les stratégies de raffinement des expériences (pièce calme, dispositions pour diminuer l'anxiété des animaux) seront réalisées par le personnel habilité qui limitera toute séparation des mères et nouveaux-nés au strict temps nécessaire à l'administration afin d'éviter tout stress aux petits et à la mère. ('Raffinement').

Retombées attendues 1) Efficacité thérapeutique de la primo-colonisation par des bactéries probiotiques et/ou commensales ou des prébiotiques 2) Elucidation des mécanismes d'action des probiotiques/prébiotiques ou bactéries commensales dans un contexte périnatale et impact à long terme dans le développement de pathologies chroniques ou infectieuses.

15032 La créatine (Cr) est une molécule qui permet aux cellules cérébrales et musculaires de se constituer une réserve d'énergie. Elle passe dans le sang et rentre dans le cerveau et les muscles via le transporteur de la créatine (CRTR). Le déficit en transporteur de la créatine lié à l'X est une maladie

neurologique rare dans laquelle l'absence de Cr au niveau cérébral conduit à des retards mentaux sévères, un syndrome autistique et des crises d'épilepsie chez les enfants. Cette maladie représente 1 à 2% des retards mentaux liés à l'X. A ce jour, aucun traitement n'est disponible. En effet, les approches par supplémentation en Cr ne sont pas efficaces du fait de l'absence de passage passif de la Cr à travers la barrière hémato-encéphalique et la membrane des cellules cérébrales en l'absence de transporteurs.

Nous avons démontré que l'utilisation du Dodecyl Creatine Ester (DCE) sous forme de microémulsion permet l'amélioration des fonctions cognitives dans un modèle murin de la maladie ainsi qu'une restauration des niveaux de Cr dans différentes aires cérébrales. Pour mieux caractériser ce composé et ses effets, il est important de mettre en place des outils de suivi non invasifs et de poursuivre ces expériences dans des modèles d'étude précliniques plus pertinents.

L'objectif de ce projet est double 1/ valider une stratégie thérapeutique innovante utilisant une microémulsion de DCE administrée par voie nasale et 2/ valider des méthodes d'imagerie originales pour suivre la restauration des niveaux de créatine cérébraux *in vivo*.

En effet, la créatine étant présente de façon naturelle dans les organismes vivants (exceptés ceux qui ont la maladie du déficit en transporteur de la créatine), nous utilisons de la créatine marquée au deutérium pour la différencier de la créatine endogène. Le deutérium porté par la créatine peut ensuite être détecté par IRM. Le bénéfice de cette étude est d'intégrer, dans un projet de développement préclinique, des outils d'imagerie permettant d'étudier la pharmacologie de molécules médicamenteuses dérivées de composés endogènes, et de raffiner les protocoles expérimentaux en utilisant moins d'animaux sur un suivi longitudinal et en évitant de sacrifier des animaux. Au-delà du bénéfice pour les projets précliniques, ces nouveaux outils d'imagerie fournissent des biomarqueurs qui trouveront une place majeure dans le contexte clinique. Ces biomarqueurs pourront permettre le suivi de l'efficacité des traitements chez les patients (enfants), et aider à l'ajustement des doses thérapeutiques.

Le projet comporte deux volets

1) Une étude sur 120 souris, dans laquelle nous évaluerons l'incorporation cérébrale et périphérique du DCE par IRM dans des animaux sains et dans des animaux transgéniques modèle de la pathologie (déficient pour le transporteur de la créatine). Nous utiliserons l'imagerie IRM du deutérium pour quantifier la créatine dans le cerveau de façon répétée et non traumatique pendant et après un traitement d'un mois. Des prélèvements sanguins seront effectués en complément, après chaque examen IRM, pour mesurer la concentration plasmatique de créatine marquée.

2) Une étude sur 6 macaques sains pour démontrer l'efficacité du mode d'administration intranasale et étudier la biodistribution cérébrale du DCE par IRM. Nous utiliserons également l'imagerie IRM du deutérium pour quantifier la créatine dans le cerveau de façon répétée et non traumatique pendant et après un traitement d'un mois. Des prélèvements de sang et de liquide céphalorachidien seront effectués en complément.

Le recours à l'animal est nécessaire, car aucun milieu de culture ou système synthétique ne permet aujourd'hui d'évaluer l'effet de cette stratégie thérapeutique d'utilisation de la voie nasale pour cibler directement le cerveau (voie « nose-to-brain ») via les nerfs olfactifs et trijumeaux. Seul un modèle animal permet de tenir compte des interactions structurelles et fonctionnelles de ces nerfs et cellules, et ainsi de valider un biomarqueur d'imagerie *in vivo* et une voie d'administration originale. Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet proviendront d'élevages reconnus. Leur nombre a été réduit au minimum nécessaire afin d'obtenir des données suffisantes pour valider les nouvelles méthodologies sous différentes conditions.

Les procédures expérimentales de ce projet ont un degré de sévérité « modéré ». Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. L'application de critères d'arrêts spécifiques et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe dans un milieu enrichi permettent de garantir le bien-être des animaux.

15033 Le présent projet est déposé dans le cadre d'un enseignement de Neurobiologie dispensé à des étudiants de 3ème année de licence de Sciences de la Vie. Cet enseignement facultatif a pour

objectif d'initier les étudiants aux principes fondamentaux du contrôle central des comportements en faisant le lien avec certaines pathologies, tout en leur apprenant les gestes de base et le respect du bien-être animal. Le comportement retenu dans le cadre de ces TP est l'activité exploratoire. L'analyse de ce comportement permet d'avoir une mesure indirecte à la fois du niveau d'activité locomotrice et d'anxiété de l'animal. L'anxiété est un phénomène normal présent chez tous les individus. Cependant, l'anxiété peut aussi devenir pathologique, on parlera alors de troubles anxieux. Ces troubles sont fréquents, et affecteraient chaque année 2 à 8 % de la population. L'abus de certaines substances comme l'amphétamine peut déclencher des états anxieux associés à une hyperactivité

Le but de ces travaux pratiques (TP) est d'étudier le comportement de la souris lorsqu'elle a été injectée de façon intra-péritonéale avec une solution saline ou une solution d'amphétamine. L'injection sera effectuée par le personnel formé à l'expérimentation animale. Les étudiants devront tester des souris dans des situations expérimentales qui ont été créées pour évaluer à la fois leur activité exploratoire et leur niveau d'anxiété le test de l'open-field, le test du clair-obscur et le test d'enfouissement de billes.

Ces TP nécessitent l'utilisation de 52 souris par an au maximum, et donc de 260 souris sur les 5 ans du projet. Dans un souci de réduction du nombre d'animaux utilisés, le design des expériences comportementales a été étudié au plus juste, en prenant en compte la puissance des analyses statistiques. De plus, toujours dans cette optique de réduction, les étudiants travailleront en binôme et testeront une souris de chaque groupe (saline ou amphétamine). Quatre séances identiques de TP sont prévues, avec deux séances par semaine. Les animaux utilisés lors de la première semaine seront réutilisés la semaine suivante et testés dans les mêmes tests comportementaux, mais cette fois les souris injectées en saline seront injectées en amphétamine, et inversement.

Dans la mesure du possible, le remplacement des animaux par des méthodes alternatives (modèles mathématiques, méthodes *in vitro*...) est préféré. Toutefois, vue la nature de la formation délivrée aux étudiants, l'utilisation de rongeurs reste nécessaire. Enfin, le raffinement des méthodes expérimentales afin de réduire à son maximum la souffrance animale est mise en œuvre grâce à l'utilisation de paradigmes comportementaux simples et non invasifs et la mise en place de points limites clairement établis. Ainsi, si en cours d'expérimentation un animal présente tout signe de détresse (douleur, perte de poids excessive, isolement...), la procédure en cours pour celui-ci sera immédiatement interrompue après avoir contacté le comité de bien-être animal. Si son état s'avère être critique, le responsable du projet en accord avec le comité de bien-être animal prendra la décision de l'euthanasier.

Une fois les 4 séances de TP réalisées, les animaux sont mis à mort par élongation cervicale. L'ensemble des expériences est mené par des personnels hautement qualifiés et dans des locaux d'expérimentation et d'hébergement agréés, respectant les standards en vigueur. Le taux d'encadrement des étudiants est d'un enseignant pour 4 binômes (8 étudiants), ce qui est plus élevé que les conditions standards des Travaux Pratiques (1 pour 20). Cela permet d'assurer une vigilance constante sur la mise en œuvre des bonnes pratiques d'expérimentation par les étudiants.

15034 Entre les repas ou lors d'un jeûne, l'organisme est capable de maintenir le taux de glucose (sucre) dans le sang (glycémie) à environ 1g/L, grâce à une production par le foie, les reins et l'intestin. Cette fonction est affectée dans le cadre d'une maladie métabolique la glycogénose de type 1. C'est une maladie rare due à une absence de production de glucose, entraînant des hypoglycémies lors de jeûne court pouvant être fatales (coma ou mort). Ainsi, une dérégulation de la production de glucose a des conséquences sur le contrôle de la glycémie.

En plus des dérégulations de la glycémie, la glycogénose de type 1 est caractérisée par le développement de complications hépatiques importantes telle que l'accumulation de graisses pouvant mener au développement de cancers hépatiques qui sont une des causes majeures de morbidité. La compréhension des mécanismes sous-jacents est nécessaire pour la mise en place de traitements adaptés. Ce projet devrait permettre de mieux définir les mécanismes moléculaires du développement tumoral en lien avec une stéatose et en présence ou non de fibrose hépatique.

Cette étude constituera à évaluer le développement de tumeurs hépatiques dans un modèle murin de glycogénose de type 1 dans des conditions favorisant le développement tumoral. Le modèle animal étudié sont des souris transgéniques dont la production de glucose est inhibée uniquement dans le foie. Ces souris développent spontanément des tumeurs hépatiques entre 12 et 18 mois, mais en l'absence de fibrose ou de cirrhose et sans perte de la fonction hépatique. Elles devraient donc être plus sensibles au développement de tumeurs hépatiques induites par un carcinogène ou un régime spécifique que les souris contrôles (saines). L'évolution de la taille des tumeurs sera suivie par imagerie scanner hebdomadaire chez des souris atteintes de glycogénose de type 1 et des souris contrôles nourries avec un régime déficient en méthionine et en choline, ou après injection d'un carcinogène. Les voies moléculaires impliquées dans le développement tumoral seront analysées par l'analyse des foies et des tumeurs.

Ce projet sera réalisé selon le respect de la règle des 3R

Remplacement : Aucune approche en culture cellulaire ne permet de développer les tumeurs et les caractéristiques de la pathologie hépatique. Notre étude nécessite donc de travailler sur l'organisme en entier pour conserver le développement de ces tumeurs qui requièrent un dialogue complexe, entre divers types de cellules hépatiques, mais aussi avec d'autres organes. Elle sera donc réalisée chez la souris grâce à une approche de transgénèse qui permet de cibler des modifications du métabolisme uniquement dans le foie.

Réduction : Le nombre de souris a été calculé au plus juste à partir des connaissances des pathologies étudiées, des modèles animaux, et du métabolisme glucidique, mais aussi des résultats d'études précédentes ayant permis de valider la preuve de concept. Afin de pouvoir faire une analyse statistique, des groupes de 10 souris seront analysés. Au total, ce projet nécessitera l'utilisation de 85 souris (mâles ou femelles) transgéniques et contrôles sans compter les souris d'élevage qui ne développent pas de pathologies.

Raffinement : Les souris seront hébergées par groupe, dans un milieu enrichi pour favoriser la nidation. Les animaux seront pesés de façon hebdomadaire pour suivre leur prise de poids. La connaissance des modèles animaux a permis de définir des points limites, en contrôlant les risques d'hypoglycémie. Pour cela, les animaux auront accès à la nourriture directement dans la cage. En cas de prostration de l'animal dans sa cage, la glycémie sera systématiquement mesurée. Les animaux avec une glycémie trop faible seront injectés avec une solution de glucose et renourris. Pour limiter les hypothermies liées au développement des hypoglycémies, les animaux auront la possibilité de se réchauffer en disposant une partie de la cage sur une plaque chauffante. La mise en place d'études « pilote » permettra d'évaluer les risques de développement tumoral précoce et ainsi de prévenir un mal-être des animaux. Le suivi du développement de tumeurs pourra être réalisé par imagerie scanner couplée à la palpation abdominale. Associé aux tests biologiques reflétant un dysfonctionnement du foie et au comportement des animaux, ce suivi des animaux permettra de mettre fin au protocole si les tumeurs sont trop nombreuses ou trop grosses ou si l'atteinte hépatique est importante. Les souris seront mises à mort à la fin du protocole ou lors de l'atteinte d'un point limite défini dans le projet selon les méthodes autorisées par la législation.

Ce projet devrait permettre de déterminer les voies moléculaires impliquées dans le développement de tumeurs hépatiques chez des souris atteintes de glycogénose de type 1. L'étude pilote permettra aussi de mettre au point les conditions d'imagerie au scanner nécessaire pour le suivi du nombre et de la taille des tumeurs.

15035 La diffusion mondiale, en constante augmentation ces dernières années, de la résistance aux antibiotiques, pose un problème majeur de santé publique. En effet, les praticiens se trouvent de plus en plus souvent dans des situations d'impasse, avec aucun antibiotique commercialisé actif pour traiter certaines infections et une augmentation de la mortalité liée à la résistance. *Escherichia coli*, encore appelé « colibacille », est une des principales bactéries impliquées dans les infections urinaires ou abdominales. Certains colibacilles très résistants sont capables de détruire pratiquement tous les antibiotiques disponibles. Faute de traitement efficace en cas d'infection par ces bactéries, le traitement antibiotique choisi repose sur des associations d'antibiotiques utilisés habituellement en dernier recours du fait de leur activité modérée et/ou de leur toxicité, mais il

n'existe pas de recommandations consensuelles de traitement, faute de données suffisantes concernant leur efficacité.

L'objectif du projet est d'évaluer l'efficacité de deux associations d'antibiotiques vis-à-vis de différents *Escherichia coli* hautement résistants aux antibiotiques, dans un modèle de péritonite de la souris. Ces associations ont été choisies sur la base d'expériences de laboratoire *in vitro* suggérant leur efficacité, mais n'ont été que peu ou pas évaluées chez l'animal. Il s'agit pourtant d'une évaluation préliminaire importante de l'efficacité des antibiotiques car il reproduit les conditions de l'infection au plus près de celles retrouvées chez l'homme. Les résultats de nos expérimentations pourront permettre de définir au mieux les associations d'antibiotiques à utiliser pour traiter ce type d'infections chez l'Homme.

Ce modèle de péritonite sera obtenu après injection dans le péritoine de souris vigiles d'une quantité importante de bactéries. Le traitement antibiotique, non douloureux, sera administré aux souris vigiles infectées. Il débutera 2h après l'injection bactérienne, avec injection des antibiotiques toutes les 2 ou 4h suivant l'antibiotique considéré et durera 24h. Toutes les souris traitées seront euthanasiées 4h après la dernière injection d'antibiotique. Le liquide péritonéal et la rate de toutes les souris seront prélevés pour déterminer si le traitement a permis de diminuer la quantité de bactéries présentes au niveau de ces organes, par rapport à des animaux qui n'auront pas reçu d'antibiotiques. Les échantillons prélevés serviront également à détecter, par des tests *in vitro*, si le traitement antibiotique a eu pour effet l'émergence de bactéries encore plus résistantes aux antibiotiques.

Nous respecterons au plus près la règle des 3R « remplacement, réduction, raffinement »

- Remplacement la complexité de la péritonite bactérienne et la variabilité des concentrations antibiotiques dans le péritoine rendent pour l'instant le remplacement de ce modèle expérimental par des modèles *in vitro* non réalisable.

- Réduction Afin de limiter le plus possible le nombre d'animaux, des travaux préliminaires *in vitro* ont été réalisés pour permettre de cibler au mieux les molécules, les associations d'intérêt et les doses nécessaires. Nous avons réduit le nombre de souris utilisés au minimum nécessaire et suffisant pour valider scientifiquement notre étude du point de vue de l'analyse statistique. Nous estimons que 759 souris au maximum seront nécessaires pour la durée du projet de 5 ans. Les groupes témoins et les groupes traités par antibiotiques comporteront chacun 15 souris.

- Raffinement Les souris seront hébergées par groupe de 5 maximum, dans des portoirs ventilés, conformément à la réglementation. Les souris seront surveillées attentivement par les expérimentateurs au minimum toutes les 4h pendant les 24h du traitement. Nous évaluerons leur état clinique grâce à une grille d'évaluation établissant les points limites en fonction de leur comportement et apparence, pour déceler toute souffrance éventuelle qui pourrait justifier une euthanasie avant la fin du traitement.

15036 La présente demande d'autorisation de projet s'inscrit dans un contexte de formations des usagers de notre plateforme. Notre objectif est de former nos utilisateurs à un ensemble de gestes expérimentaux préhensions et contentions des animaux, injections en sous cutanée, en intra-péritonéale, per-os (gavage), en intra veineuse, au prélèvements de sang ainsi qu'à la mise à mort des animaux. L'objectif correspond à une obligation réglementaire puisque l'ensemble des utilisateurs d'un établissement utilisateur doit être compétent pour les gestes effectués sur l'animal et l'établissement utilisateur doit s'assurer de la compétence de ses usagers.

Notre service est ouvert à l'ensemble de la communauté scientifique souhaitant mener des projets de recherches *in vivo* et remplissant les conditions de formations initiales et continues réglementaires. A ce titre, nous accueillons environs une vingtaine de nouveaux entrants chaque année qui sont pour l'essentiel des chercheurs doctorants ou post -doctorants.

L'enjeu de cette demande d'autorisation de projet s'inscrit dans un contexte de formation et d'acquisitions des gestes de bonnes pratiques d'expérimentations animales. Les bénéfices attendus sont très importants car au-delà du respect de la législation notre objectif est de réduire le nombre

d'animaux utilisés au cours des projets ainsi que la souffrance des animaux grâce à l'acquisition des bonnes pratiques.

Dans le respect de la règle des 3R

-Afin de restreindre le nombre d'animaux nous utiliserons des animaux de production destinés à être mis à mort car trop vieux et donc stérile. L'absence de méthodes substitutives à l'utilisation d'animaux est justifiée ici car les gestes envisagés ne peuvent se pratiquer que sur des animaux vivants. Dans le but de limiter le nombre d'animaux nous combinerons un ensemble de gestes sur les mêmes souris.

Afin de respecter la notion de raffinement, le bien-être de nos animaux sera pris en compte de leurs naissances à leurs morts condition d'élevage des animaux adaptée, présence d'enrichissement dans les cages, visite quotidienne par du personnel qualifié. De plus lorsque cela est nécessaire les animaux seront anesthésiés et surveillés. De même, la formation débutera par un entraînement sur animal mort. Pour l'ensemble de ces formations des critères d'arrêt par rapport à la souffrance strictes seront appliqués. Le choix de l'espèce est en corrélation avec son utilisation dans l'EU.

Nous demandons pour réaliser l'ensemble de ces formations 1000 souris au total sur 5 ans.

15037 L'efficacité des anticorps anti-PD1, anti-CTLA4 ou leur combinaison sur le cancer de la prostate fait actuellement l'objet de nombreuses études cliniques. Ces immunothérapies sont administrées chez des patients sous castration hormonale, souvent en association avec une hormonothérapie de nouvelle génération qui bloque directement le récepteur aux androgènes ou qui inhibe la synthèse des androgènes. Le but d'une immunothérapie par les anticorps anti-PD1, anti-CTLA4 ou leur combinaison est une réinduction de la réponse immunitaire qui se trouve supprimée par les cellules cancéreuses. Cependant, certains patients développent une résistance à ces immunothérapies. Des résultats obtenus au sein de notre laboratoire ont démontré le rôle crucial de la flore intestinale dans l'activation du système immunitaire anti-tumoral permettant d'améliorer l'effet de thérapies anti-cancéreuses, notamment de l'anti-CTLA4, de l'anti-PD1 et du cyclophosphamide. Or chez les patients atteints d'un cancer, de nombreux facteurs entraînent un déséquilibre de la flore intestinale (on parle alors de dysbiose) et qui pourrait être impliqué dans la résistance à ces traitements. Par conséquent, notre objectif est d'analyser l'influence de la flore intestinale sur la sensibilité aux traitements anti-PD1, anti-CTLA4 et la combinaison des deux dans le cas d'un cancer prostatique et dans un contexte de déprivation hormonale. Pour cela, nous collectons les fèces de patients atteints de cancer de prostate afin de réaliser des transplantations fécales chez la souris castrée, qui possèdera alors les bactéries de la flore intestinale des patients. Par ailleurs, nous administrerons des bactéries spécifiques ou des cellules immunitaires préalablement activées par des bactéries ayant été démontré comme activant la réponse immunitaire anti-tumorale et favorisant l'effet de thérapies anti-cancéreuses. Puis, après injection de lignées tumorales prostatiques, les souris seront traitées avec anti-PD1, anti-CTLA4, la combinaison anti-PD1+ anti-CTLA4. Ces manipulations vont nous permettre de caractériser la composition en bactéries de la flore intestinale des patients, en étudiant les conséquences sur la progression tumorale, l'efficacité anti-tumorale des traitements ainsi que sur l'activation du système immunitaire. Ces résultats devraient également permettre de sélectionner les patients pouvant bénéficier d'une supplémentation en bactéries afin d'améliorer leurs réponses aux immunothérapies.

Ce projet nécessite des procédures expérimentales utilisant des animaux vivants et plus particulièrement la souris. En effet, il est actuellement impossible de reconstituer un système immunitaire ex-vivo du fait de sa complexité. Or, l'objet de ce projet est d'étudier l'effet d'anticorps à action immunologique (immunothérapie). Les expériences ne peuvent donc pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants (nécessité d'un organisme entier, vivant, avec un système immunitaire complexe, proche de l'homme, porteur de tumeur) Le projet nécessitera 3360 souris. Ce nombre important d'animaux se justifie par les différentes combinaisons thérapeutiques, le nombre de prélèvements fécaux et l'étendue de la diversité de la flore intestinale.

Les procédures expérimentales mises en jeu respecteront les exigences de réduction et raffinement. D'une part, les groupes seront constitués d'un minimum d'animaux assurant la fiabilité des résultats en termes de statistiques. Le nombre de prélèvements pré- et post-mortem seront optimisés afin d'étudier le plus de paramètres possibles et ainsi d'éviter la répétition d'expérimentation. Enfin, les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux, en ayant recours à l'anesthésie et en exerçant une surveillance étroite et des soins spécifiques.

15038 La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est la première cause de malvoyance après 50 ans et on estime à un million le nombre de personnes concernées. A ce jour, la cause précise de la maladie est encore inconnue, mais plusieurs hypothèses concernant le développement de la pathologie ont été proposées, et notamment le rôle très probable de la toxicité lumineuse et du stress oxydant sur la mort des cellules de la rétine.

Le but de ce projet est de tester l'effet d'agonistes adrénergiques sur le phénotype rétinien de souris présentant des caractéristiques de la DMLA. Les effets de ces agonistes ont été préalablement validés dans trois modèles cellulaires dans lesquels il a été montré qu'ils agissent sur des mécanismes permettant de réduire l'accumulation de la lipofuscine, une des caractéristiques de la pathologie. Le développement d'un médicament visant à traiter la DMLA chez l'homme pourrait découler de ces expériences.

Un total de 640 souris sera utilisé pour réaliser ces expériences sur une durée totale de 5 ans, ce qui représente une moyenne de 114 souris par an. Les traitements seront réalisés soit par gavage quotidien soit par injection intra-péritonéale ou intra-vitréenne.

La règle des 3R sera appliquée. Remplacer Ce projet fait suite à plusieurs tests sur cellules démontrant sans conteste le potentiel des molécules d'intérêt en thérapie humaine. La validation des effets thérapeutiques chez l'animal est donc à ce stade indispensable pour envisager un développement thérapeutique. Réduire Nous réduirons au minimum le nombre de souris par groupe afin de pouvoir réaliser un test statistique (en tenant compte d'une perte possible de 10 à 20 % des souris en cours d'expérimentation). Raffiner Les souris seront d'abord acclimatées aux zootekiciens afin de réduire au maximum le stress engendré par le gavage. Elles seront pesées chaque semaine et observées quotidiennement, et leur comportement lors du gavage sera reporté par écrit. Toutes les manipulations le nécessitant seront réalisées sous anesthésie générale et/ou locale et des traitements préventifs (antibiotique, anti-inflammatoire) seront utilisés afin de réduire les risques d'infection et de douleur. Le poids et l'apparence physique des souris seront vérifiés tout au long des procédures expérimentales. Une perte de poids supérieure à 20% ou un signe révélateur de souffrances engendrera une euthanasie. Le comportement et la posture des souris seront également observés afin d'évaluer le degré de bien-être ou de douleur.

15039 Ce projet concerne l'identification de marqueurs moléculaires d'une structure cérébrale, la tVTA. Cette structure est un centre de contrôle inhibiteur de l'activité de neurones contenant de la dopamine qui, dans le cerveau, sont importants dans l'étiologie ou le traitement de diverses pathologies neurologiques ou psychiatriques, comme la maladie de Parkinson, l'addiction, la schizophrénie ou la dépression. Pour progresser dans la compréhension des fonctions de la tVTA et permettre notamment de moduler sélectivement son activité, il est aujourd'hui nécessaire de disposer de marqueurs sélectifs de cette structure cérébrale en conditions contrôle et pathologique. Ce projet vise à identifier les marqueurs génomiques de la tVTA ainsi que leurs modifications d'expression dans des modèles de dépression d'étiologie diverse.

En accord avec la règle des 3R :

Réduire Pour optimiser l'étude et réduire le nombre final d'animaux utilisés, les expériences seront menées par lots successifs de 6 animaux par groupe et dès que des résultats statistiquement significatifs seront obtenus, les expériences seront arrêtées. Le nombre alors maximal d'animaux utilisés a été évalué à 414 animaux sur une période de 5 ans.

Remplacer Nous ne pouvons pas avoir recours à des méthodes alternatives pour réaliser ce projet de neuroanatomie. En effet, le but est d'étudier une structure du cerveau nouvellement décrite, ce qui implique forcément l'accès à cette structure cérébrale qui n'existe que chez les vertébrés.

Raffiner Durant les expériences les animaux (rats) seront hébergés en cages collectives (2 ou 3 animaux/ cage), du matériel de nidation (frisure) ainsi que des barreaux à ronger seront mis à la disposition des animaux, les animaux ont un accès libre à la nourriture et l'eau et sont stabulés sous cycle lumière/obscurité de 12h, à température et hygrométrie contrôllées.

Avenant : Grâce à l'analyse moléculaire de la tVTA nous avons mis en évidence des changements génomiques importants au niveau de la transmission neuronale glutamatergique dans des modèles de dépression d'étiologie diverse. Nous souhaitons maintenant :

- 1) étudier plus en détails le rôle des projections glutamatergiques vers la tVTA
- 2) confirmer ces données moléculaires obtenues par d'autres méthodes protéomiques.

15040 Contexte La technologie des ultrasons focalisés, connue par l'acronyme HIFU, permet de détruire des tissus pathologiques sans incision. Une sonde émet des ultrasons qui traversent la peau et se concentrent sur le tissu à traiter où ils induisent un échauffement local important. Le geste est guidé en temps réel par échographie. Les HIFU sont déjà utilisés de manière commerciale pour traiter notamment les cancers de la prostate, les fibromes utérins, les varices, les nodules thyroïdiens, et de nombreuses autres applications cliniques sont en développement. Ils constituent généralement une alternative ambulatoire et non-invasive aux méthodes chirurgicales. Cette modalité pâtit généralement toutefois d'un temps de traitement plus long, qui freine son adoption.

Objectif général. Dans ce contexte, le but de cette étude est d'évaluer l'apport de solutions techniques diminuant l'échauffement de la peau durant les traitements et permettant ainsi une cadence de tir plus rapide.

Modèle animal et méthode L'emploi d'animaux est rendu nécessaire par l'influence de la dynamique du flux sanguin sur les transferts de chaleur au niveau de la peau. L'étude impliquera 65 lapins et ne nécessitera pas de suivi distant.

Dans le cadre de la règle des 3R, une première phase de l'étude consistera à acquérir des données pour calibrer un modèle informatique. Ceci permettra de sélectionner les 4 solutions techniques les plus prometteuses. Cette première phase nécessite 5 lapins.

Quatre solutions techniques seront ensuite évaluées sur 15 lapins chacune. Pour chacun des groupes de 15 lapins, 5 seront utilisés pour valider la puissance maximale de tir autorisée et 10 seront utilisés pour valider la fréquence de répétition des tirs permettant de ne pas engendrer de dommages à la peau. Dans le cadre de la règle des 3R (réduction du nombre d'animaux) 6 emplacements de tir seront utilisés pour chaque animal.

L'énergie ultrasonore sera appliquée par voie externe. Tous les lapins seront anesthésiés durant l'ensemble de la procédure (Raffiner). Des mesures à la caméra thermique seront prises à divers moment lors du traitement et des photographies des zones d'intérêt permettront de documenter l'aspect de la peau. Les animaux seront sacrifiés immédiatement après.

15041 Les lymphocytes CD8 sont des cellules du système immunitaire responsables de l'élimination des cellules infectées (par un virus ou une bactérie intracellulaire) ou tumorales. Lors d'une infection par un pathogène intracellulaire, les cellules CD8 naïves sont activées et se différencient d'une part en CD8 effectrices capables d'éradiquer les cellules infectées et d'autre part en CD8 mémoires, plus efficaces pour lutter contre une nouvelle rencontre avec un pathogène ou une tumeur. Pour cela, il est primordial pour les lymphocytes T CD8 mémoires de se maintenir dans l'organisme sur le très long terme.

La maintenance des lymphocytes T CD8 mémoires est définie comme la capacité des cellules à se maintenir à un nombre constant au cours du temps. Ceci est permis grâce à un équilibre entre la mort cellulaire, et la prolifération cellulaire. Grâce à l'utilisation de souris porteuses de mutations qui accroissent la maintenance des lymphocytes T CD8, le but de ce projet est de comprendre 1- les

mécanismes moléculaires et cellulaires liés à maintenance des lymphocytes T CD8 2- le rôle de l'environnement procuré par la moelle osseuse dans la survie et/ou la prolifération des lymphocytes T CD8 mémoires; 3- s'il existe une sous-population spécifique de lymphocytes T CD8 mémoires qui auraient des propriétés de maintenance accrues.

Pour cela, des souris transgéniques ou ayant reçu des lymphocytes T CD8 mutés seront infectés par des virus pulmonaires afin de générer une réponse puis une mémoire.

Le projet nécessitera l'utilisation de 1383 souris maximum. Le nombre d'animaux par groupe a été réduit au maximum sans toutefois compromettre l'analyse statistique des résultats.

Le choix du modèle murin est imposé par la nécessité de pouvoir utiliser des animaux génétiquement modifiés. De plus, la mise en place d'une mémoire immunitaire est un phénomène biologique complexe et dynamique, faisant intervenir de multiples types cellulaires et dont l'organisation spatiale rend impossible son étude dans des tests *in vitro*.

Les procédures et points limites adaptés ont été définis afin de réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage que pourraient ressentir les animaux.

15042 Le cancer du sein est le deuxième cancer le plus répandu dans le monde. Beaucoup de tumeurs réagissent bien aux traitements hormonaux, y compris le tamoxifène. Cependant, la réussite du traitement reste plus faible dans les tumeurs métastatiques, avec ~ 30 % des cas où l'hormonothérapie est inefficace et dans les cas où elle est efficace, les patients acquièrent souvent une résistance à terme. Par conséquent, des traitements alternatifs sont nécessaires pour ces types de cancer du sein.

Parmi les classes de cibles thérapeutiques les plus prometteuses émergent les régulateurs épigénétiques. Des données transcriptomiques et génomiques du cancer ont été explorées afin d'identifier de nouveaux facteurs épigénétiques susceptibles d'être des cibles thérapeutiques convenables pour le cancer du sein. Cela a conduit à l'identification d'une nouvelle cible médicamenteuse pour le cancer du sein, qui régule la signalisation oncogénique *in vitro*.

La preuve de concept *in vitro* ne suffisant pas pour valider les propriétés oncogéniques de ce gène, nous devons utiliser des modèles murins dans le but d'étudier son impact sur la progression de la tumeur *in situ* ainsi que métastatique. Les modèles de xénogreffes murines que nous avons choisis sont largement validés par la communauté scientifique.

L'objectif de ce projet est de déterminer si ce gène d'intérêt est oncogène dans les modèles de xénogreffes murines. Dans la première procédure, il sera effectué un essai de gain de fonction, dans lequel l'effet de la surexpression du gène d'intérêt sur la capacité des cellules cancéreuses de sein humain à former des tumeurs sera analysée. Les cellules seront injectées par voie sous-cutanée chez la souris et la croissance de la tumeur sera mesurée. Dans une deuxième procédure, un test de perte de fonction sera réalisé. L'effet de l'inhibition du gène d'intérêt sur la capacité des cellules humaines de cancer du sein à former des tumeurs pulmonaires métastatiques sera étudié. Les cellules seront injectées chez la souris par voie intraveineuse. Le développement de métastases pulmonaires sera suivi par imagerie. Grâce à l'imagerie sur souris vivantes, la progression de la tumeur peut être suivie au cours du temps. Cette technologie permet donc de réduire considérablement le nombre de souris utilisées.

L'utilisation d'anesthésie et l'analgésique permettent de réduire l'inconfort des souris. Le nombre de souris par groupe a été réduit au maximum sans mettre en péril une interprétation statistique de nos résultats. Un total de 284 souris maximum sera nécessaire.

Retombées attendues dans le domaine de la cancérologie

Nos études pourront conduire à de nouvelles stratégies thérapeutiques, vu que les facteurs épigénétiques ont récemment émergé comme cibles convaincantes de médicament dans le cancer. Le développement de ces thérapies dans le futur pourrait offrir des meilleures options aux patients.

15043 L'émergence récente du nouveau coronavirus humain SARS-CoV-2 précipite la communauté scientifique dans l'inconnu. En effet, ce virus, susceptible d'émerger sur le continent européen, est

totallement nouveau. Il est donc urgent de développer des thérapeutiques antivirales (molécules antivirales, vaccins) contre ce nouveau virus.

L'objectif de ce projet, d'une durée maximale de 5 ans, est de tester des thérapeutiques antivirales qui pourraient ensuite être utilisées chez l'homme.

Il se décomposera en deux phases

- La mise au point d'un modèle animal pour le SARS-CoV-2 (souris ou hamster).
- L'évaluation de l'efficacité de molécules antivirales seules et/ou en association ainsi que de candidats vaccins pour prévenir/traiter l'infection chez l'animal.

Il est prévu de tester quatre molécules antivirales et deux associations de molécules (bithérapie) ainsi que 9 candidats vaccins. Toutes ces thérapeutiques auront été préalablement étudiées de façon poussée *in vitro*.

Le nombre d'animaux utilisés lors de ce projet, décomposé en 3 procédures de sévérité classifiées 'sévères' est estimé à 1440 souris sur 5 ans si un modèle souris est choisi ou 120 souris + 1362 hamsters sur 5 ans si un modèle hamster est choisi.

Application des 3 Rs

La recherche sur les thérapeutiques antivirales rend par nature indispensable le recours à l'expérimentation animale. Le recours à l'animal vivant pour répondre aux objectifs de ce projet est donc indispensable et aucune méthode alternative ne peut le remplacer.

Cependant, la taille des lots d'animaux a été ramenée au minimum nécessaire pour assurer la validité des résultats. De plus, notre expertise en virologie, et plus particulièrement sur les maladies virales émergentes, ainsi que les résultats obtenus lors de projets précédents nous permettent d'optimiser certains paramètres expérimentaux. Enfin, afin de réduire encore le nombre d'animaux utilisés, les thérapeutiques antivirales seront préalablement étudiées de façon poussée en cellules et une série d'études pilotes avec un nombre restreint d'animaux sont prévues dans ce projet et permettront par exemple de réduire rapidement le nombre de thérapeutiques antivirales étudiées.

Nous serons vigilants en ce qui concerne les signes de maladie et d'inconfort des animaux testés et les animaux seront surveillés quotidiennement et pris en charge par du personnel formé et expérimenté. Les animaux seront anesthésiés lorsque cela est nécessaire, un scoring expérimental a été mis en place afin de travailler avec des points limites suffisamment précoces et des analgésiques seront administrés aux animaux pour réduire au maximum la douleur, la souffrance et l'angoisse.

Les animaux seront hébergés en ISOcages, dans un portoir ventilé sans transmission de vibration, avec un cycle jour/nuit 14h/10h, une température de 21 +/-1°C, une alimentation adaptée en accès libre ainsi que de l'eau de boisson en accès libre.

15044 Le « système moteur » est principalement composé par le groupe de noyaux appelé « les ganglions de la base ». Ce système fortement conservé chez les mammifères, y compris l'homme, est un système complexe des connexions entre différents noyaux fortement régulé par plusieurs mécanismes agissant en différentes étapes, et toujours ces mécanismes sont à clarifier complètement. Le système des ganglions de la base est aussi la principale cible des maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson et la maladie de Huntington. Dans le monde, on estime que 6,3 millions de personnes sont atteintes de la maladie de Parkinson sans distinction de race ou de culture, avec une incidence plus élevée chez les hommes que chez les femmes. Selon les statistiques disponibles, 1,2 million de personnes en Europe sont atteintes de la maladie de Parkinson. Les principaux symptômes de la maladie de Parkinson sont les tremblements, la lenteur des mouvements et la raideur musculaire, ce qui conduit à l'impossibilité totale d'indépendance dans les affaires courantes. Ainsi, d'autres troubles comme un état dépressif, une fatigue, ou des troubles digestifs peuvent être associés. Les traitements présents aujourd'hui visent à réduire les symptômes sans agir sur le mécanisme pathologique et ils sont fortement associés à des effets collatéraux graves. D'ici la nécessité de mieux comprendre les mécanismes physiologiques et pathologiques des ganglions de la base. Pour nous, un possible candidat qui

pourrait être important dans le control des ganglions de la base est le système endocannabinoïde. Dans le cerveau, l'action du principal composé psychoactif du cannabis passe par un ensemble de molécules, appelées collectivement « système endocannabinoïde ». Ce système contrôle de très nombreuses fonctions du corps humain. Il est notamment impliqué dans le contrôle moteur et la coordination. Avec ce projet, nous voulons comprendre le mécanisme physiologique par lequel les cannabinoïdes agissent sur les fonctions motrices, et leurs implications possibles dans les maladies neurodégénératives affectant ces fonctions. La durée de ce projet sera de 5 ans. Il est essentiel d'utiliser des souris car nous voulons étudier des mécanismes et circuits neuronaux conservés chez les mammifères y compris l'homme. Ainsi, l'usage des invertébrés qui ont un système nerveux complètement différent serait inapproprié. Pour analyser nous allons utiliser au maximum 1920 souris avec différentes méthodologies le but principal du projet c'est la mise en place d'un modèle qui nous permet de manipuler le système endocannabinoïde dans les ganglions de la base, grâce à l'utilisation de lignées de souris transgéniques ou des modèles chirurgicaux. Ensuite, nous voulons vérifier l'impact de cette manipulation sur la fonctionnalité des circuits neuronaux concernés, avec des tests comportementaux de motricité ou l'analyse d'expression de protéines. D'un point de vue méthodologique, nous nous engageons à respecter la règle des 3R (remplacement, réduction, raffinement) : Remplacement : Certaines expériences ont déjà été faites *in vitro* en utilisant des méthodes alternatives (cultures cellulaires *in vitro*, modélisation *in silico*,) qui sont bien pour l'étude de mécanismes moléculaires intracellulaires, pourtant pour vraiment comprendre la physiologie et les pathologies relatives au système moteur nous avons la nécessité de recourir à un modèle *in vivo* qui nous permettra d'étudier les comportements moteurs sous les différentes conditions. Réduction Les animaux utilisés dans chacun des groupes expérimentaux n'excéderont pas 15 animaux c'est à dire le nombre minimal permettant l'application de tests statistiques classiques dans le domaine. Les nombres prévus permettent de garantir une bonne interprétation des résultats. Néanmoins, si l'expérience nous montre que les échantillons peuvent être encore réduits, ils le seront en conséquence. Raffinement : Les animaux sont observés quotidiennement par un personnel qualifié. Afin de raffiner les conditions de vie des animaux inclus dans l'étude, les animaux seront hébergés en groupes sociaux et les cages d'hébergement seront enrichies de matériel de nidification, et le bien-être de l'animal sera suivi quotidiennement au cours de l'étude. La mise en place des points limites chez l'animal repose sur une évaluation comportementale des animaux lors de la visite quotidienne. Dans le cas de procédures chirurgicales, des protocoles appropriés d'anesthésie et d'analgésie seront appliqués et les animaux seront maintenus sur un tapis chauffant tout au long de la chirurgie, afin d'éviter toute hypothermie. Le suivi post-opératoire sera effectué quotidiennement pour s'assurer de la récupération complète des animaux. Des points limites spécifiques ont été prévus pour ce type de procédure.

15045 Les cancers de l'ovaire représentent l'un des cancers les plus communs chez la femme. Il existe plusieurs types de cancers de l'ovaire. La majorité des cancers de l'ovaire sont des tumeurs à cellules épithéliales (environ 80%), les cellules épithéliales formant la couche externe de l'ovaire. Et environ 7% des cancers de l'ovaire sont des tumeurs du stroma, le stroma étant le tissu de soutien de l'ovaire. Les tumeurs de la granulosa de l'ovaire sont les tumeurs stromales malignes les plus courantes. Les traitements actuels pour ce type de tumeurs sont la chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie. Cependant des rechutes peuvent survenir des années après le début de ces traitements.

L'immunothérapie, qui consiste à stimuler le système immunitaire, représente une option thérapeutique intéressante dans ce type de cancer. Une des stratégies d'immunothérapie consiste à vacciner avec des peptides issus d'antigènes tumoraux. La vaccination va induire une réponse immunitaire durable contre les cellules tumorales exprimant cet antigène.

Lors de récurrences ou à un stade métastatique, les tumeurs de la granulosa de l'ovaire sur-expriment une protéine. Cette protéine représente ainsi un antigène tumoral intéressant et une cible en immunothérapie. Des études *in silico* ont permis d'identifier des peptides dérivés de cette protéine, qui seraient potentiellement capable d'induire une réponse immunitaire (immunogénicité).

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'immunogénicité de cette protéine et des peptides dérivés dans le cadre d'une vaccination anti-tumorale *in vivo*.

Cependant une barrière d'espèce existe, en effet des peptides humains ne sont pas toujours immunogènes chez la souris. C'est pourquoi des souris dites « humanisées » ont été développées et permettent de tester l'immunogénicité de peptides humains *in vivo*. Les cellules immunitaires de ces souris expriment des molécules humaines nécessaires pour reconnaître les antigènes peptidiques humains.

Seule l'expérimentation *in vivo* chez la souris, intégrant l'ensemble du système immunitaire, nous permet d'étudier et de reproduire fidèlement la réponse immunitaire.

Dans un premier temps nous évaluerons les réponses immunes induites après vaccination avec la protéine ou avec le pool de peptides, en association avec 3 adjuvants différents utilisés en clinique.

Dans un second temps, des souris seront greffées avec une lignée tumorale exprimant cette protéine, puis vaccinées avec la meilleure association de vaccin (soit protéine ou pool de peptide + meilleur adjuvant).

Cette étude nécessitera un total de 192 souris pour une période de 3 ans.

Toutes les procédures expérimentales ont été pensées et élaborées dans le respect des 3R pour obtenir des résultats statistiquement satisfaisants avec un nombre réduit d'animaux. Certains paramètres expérimentaux (stratégies vaccinales, modèles tumoraux, nombre de cellules à implanter, nombres d'animaux suffisants pour des études statistiques) ont déjà été déterminés par des études précédentes et antérieures et publiées. Chaque procédure expérimentale sera optimisée afin de récupérer le maximum d'échantillons possible sur le même animal pour réaliser toutes les analyses

Dans les modèles de tumeurs nous nous attacherons à réduire au maximum la douleur des animaux. Pour chaque procédure, des points limites et des critères d'arrêt sont définis ce qui permettra de limiter au maximum la souffrance animale et entraînera l'euthanasie anticipée de l'anticipé de l'animal.

Ce projet permettra d'évaluer un nouveau vaccin, qui pourrait être évalué en clinique pour le traitement des tumeurs de la granulosa de l'ovaire chez la femme.

15046 Certaines maladies cardiaques congénitales sont mortelles si elles ne sont pas prises en charge dès la naissance. Ces situations nécessitent un mélange de sang important entre sang oxygéné et sang désoxygéné pour permettre une perfusion adaptée de l'organisme entier grâce à la présence d'une communication interne au muscle cardiaque entre l'oreillette gauche (sang oxygéné) et l'oreillette droite (sang désoxygéné) c'est la communication inter-atriale (CIA). Si celle-ci n'est pas présente naturellement à la naissance, il est indispensable de la créer dès les premières heures de vie pour permettre la survie de ces enfants en attendant leur chirurgie. La procédure de création de cette CIA, ou atrioseptostomie, est un acte couramment utilisé aujourd'hui par une méthode invasive en utilisant un ballonnet remonté jusqu'au cœur à partir d'un vaisseau sanguin sous-cutané, et a bien démontré son efficacité en améliorant la survie de ces enfants. Il existe cependant certaines complications dont certaines sont graves, rendant intéressante l'utilisation possible des ultra-sons focalisés à haute intensité (HIFU) qui ont un potentiel médical encore largement inexploré en cardiologie. Leur intérêt réside dans le fait qu'ils sont capables d'induire la destruction de tissu à distance. Ainsi l'utilisation des HIFU permettrait de réaliser une CIA chez ces patients et cette technique non-invasive serait une révolution dans la stratégie de la prise en charge de ces enfants. L'objectif de ce projet est de préparer la translation au nouveau-né humain et donc de démontrer que l'atrioseptostomie non-invasive par HIFU est réalisable dans un modèle porcin.

Le projet prévoit d'utiliser au maximum 16 porcelets de 1 à 2 semaines d'âge. La fréquence cardiaque, la taille du cœur, l'anatomie coronaire, l'innervation, la circulation collatérale native du porc sont très proches de celle de l'Homme. Le plan général du projet doit s'effectuer en 3 étapes. D'abord effectuer les repérages anatomiques des cœurs des porcelets par scanner, par échocardiographie, et finalement par le prélèvement complet, et de faire des premiers essais *ex vivo* avec l'appareil émetteur des HIFU. La deuxième étape consiste à effectuer une première série

d'essais de faisabilité in-vivo sous anesthésie en faisant varier les paramètres des HIFU, et à vérifier par prélèvement anatomique leurs effets (analyse post-mortem). Enfin la troisième étape se propose de réaliser une série complète d'utilisation des HIFU in-vivo sous anesthésie, avec un contrôle échocardiographique et un scanner réalisés le jour même de l'essai avec les HIFU. Deux semaines plus tard, la pérennisation de la CIA et l'absence de complications seront vérifiées à nouveau par imagerie et à l'aide d'une analyse post-mortem.

Seule l'utilisation d'animaux permet d'atteindre l'objectif du projet, qui vient en complément de tout autre méthode alternative, et qui doit rester le plus proche de la réalité clinique humaine pour rester scientifiquement valable. Nous prévoyons d'utiliser le minimum possible d'animaux, tout en restant sur un nombre acceptable par la communauté scientifique. L'anesthésie et l'analgésie seront adaptées afin de n'induire aucune souffrance, et des vétérinaires contrôleront régulièrement l'état de santé des animaux. Ils seront hébergés selon les normes en cours (enclos >2m² avec sciure et jouet), et nous veillerons à la bonne qualité des soins et à leur bien-être pendant toute l'expérimentation.

15047 Le diabète de type 2 est un problème majeur de santé publique. Il est en constante augmentation dans notre société. En cause une augmentation de la prévalence de l'obésité, soit une augmentation de la masse du tissu adipeux. Le développement excessif du tissu adipeux perturbe les fonctions de l'adipocyte, cellule majoritaire du tissu adipeux, qui ne peut plus remplir ses fonctions pour le maintien de la glycémie. Lors de l'obésité, on observe un changement d'expression d'un grand nombre de protéines dans l'adipocyte. Nous étudions une de ces protéines, un anti-oncogène, dont l'expression est fortement augmentée dans l'adipocyte de souris et de patients avec une obésité. La surexpression de cet anti-oncogène dans l'adipocyte en culture inhibe ses fonctions métaboliques et perturbent ses fonctions sécrétoires, pouvant donc contribuer au développement du diabète de type 2.

L'obésité et les complications métaboliques associées est une pathologie complexe qui fait intervenir plusieurs tissus (tissus adipeux blancs/beiges et brun, foie, muscles, pancréas, cerveau, intestin), le système immunitaire, et le microbiote intestinal. Son développement n'est pas modélisable dans un contexte cellulaire simple. Nous avons généré dans le cadre réglementaire une souris invalidée pour cet anti-oncogène dans les tissus adipeux (blancs et brun) pour déterminer si l'absence de cet anti-oncogène permettait de prévenir les défauts métaboliques causés par un régime riche en lipides provoquant l'obésité, comme attendu étant donné nos données *in vitro*. Les souris nourries avec un régime standard n'ont pas de phénotype. Cependant, le phénotype de ces souris après un régime riche en lipides est inattendu elles grossissent plus et présentent des perturbations de l'homéostasie glucidiques plus importantes. L'absence de l'anti-oncogène étudié inhibe la dépense énergétique sans modifier l'activité physique ni la prise alimentaire. Nos données de morphologie des différents tissus adipeux et celles d'expression génique suggèrent que le tissu adipeux brun est dysfonctionnel dans les souris n'exprimant plus cet anti-oncogène dans tous les sous-types d'adipocytes. Comme la fonction thermogénique du tissu adipeux brun contribue à la dépense énergétique et participe au maintien du poids corporel, nous émettons l'hypothèse que l'absence de l'anti-oncogène dans les adipocytes blancs et/ou brun perturbe la fonction thermogénique du tissu adipeux brun provoquant ainsi l'obésité observée. Le fait que l'expression de l'anti-oncogène étudié soit augmentée dans les adipocytes lors de l'obésité, que cette augmentation d'expression concerne la souris et l'homme, et que les expériences *in vitro* n'avaient pas permis de prédire le phénotype des souris invalidées pour cet anti-oncogène dans tous les d'adipocytes, justifient la nécessité d'utiliser des animaux pour tester notre hypothèse, car aucune méthode alternative n'existe.

Pour tester cette hypothèse, nous allons étudier des souris n'exprimant plus l'anti-oncogène dans tous les tissus adipeux et des souris n'exprimant plus l'anti-oncogène uniquement dans le tissu adipeux brun. L'inactivation spécifique d'un gène uniquement dans les tissus adipeux blancs n'est pas techniquement possible. Les souris n'exprimant plus l'anti-oncogène dans tous les sous-types d'adipocytes sont déjà hébergées dans notre animalerie et n'ont aucun phénotype dommageable. L'absence de l'anti-oncogène uniquement dans le tissu adipeux brun ne devrait donc pas non plus

entraîner un phénotype dommageable. De plus, le modèle de souris que nous utilisons ne développe sous régime riche en graisses que les premières phases qui peuvent conduire au diabète de type 2, c'est-à-dire présence de glucose dans les urines. Les souris ne développent donc pas les symptômes causés par la glycosurie dont les plus visibles sont la perte de poids et la prise accrue de nourriture et d'eau. Le régime riche en graisses est donc peu dommageable pour nos souris.

Les expériences que nous allons utiliser pour tester les altérations métaboliques de la souris sont peu invasives (injections intrapéritonéales avec des aiguilles fines adaptées une petite incision sur la veine de la queue au maximum une fois pendant toute la durée des procédures). Les expériences que nous allons utiliser pour tester la fonction thermogénique des souris n'affectent que faiblement les conditions de vie des souris puisqu'il s'agit d'une mesure non invasive grâce à l'utilisation d'une caméra thermique. Les souris sont manipulées une fois par semaine pour suivre leur poids diminuant ainsi le stress lié à la préhension par l'expérimentateur et les groupes ne sont jamais mélangés pendant la procédure. Toutes les souris entrées dans les procédures seront euthanasiées à leur achèvement. Un maximum d'organes sera prélevé sur chaque souris en fin de procédure pour déterminer les mécanismes moléculaires sous-jacents aux effets biologiques observés.

Pour satisfaire à la réduction chaque procédure prévoit d'utiliser le nombre minimum d'animaux nécessaire à des études statistiques pertinentes. Ce nombre a été déterminé dans chacune des procédures par le logiciel G*Power grâce aux caractéristiques statistiques de chacune des variables étudiées et de l'effet attendu. Pour l'ensemble du projet nous utiliserons au maximum 636 souris mâles dans 3 procédures. Pour le raffinement, l'hébergement sera réalisé dans des locaux appropriés et les souris seront hébergées à 3 ou 4 par cage. Les personnes réalisant les procédures sont autorisées et appliqueront les règles d'éthique. L'environnement est amélioré pour diminuer le stress par l'ajout dans les cages de tiges de papier et d'un igloo transparent rouge. Le suivi sanitaire journalier permet d'identifier les souris souffrantes et de prendre les mesures nécessaires le plus rapidement possible. La réalisation de l'ensemble du projet devrait prendre 5 ans.

Ce projet présentera un rapport avantages/dommages positif puisqu'il doit contribuer à améliorer nos connaissances des mécanismes moléculaires impliqués dans le développement de l'obésité et des désordres métaboliques associés et de proposer des pistes de développement thérapeutique contre ces maladies.

15048 À l'état physiologique, le cerveau est protégé des xénobiotiques circulants dans le sang par plusieurs barrières appelées « interfaces sang-cerveau ». Les mécanismes de neuroprotection présents au niveau de ces interfaces au stade périnatal diffèrent de ceux présents chez l'adulte, mais sont encore mal définis.

Au cours des pathologies périnatales, les barrières sang-cerveau peuvent être altérées le cerveau est alors exposé directement aux toxiques sanguins ce qui participe à l'apparition de déficiences cérébrales chez l'enfant.

Enfin, les interfaces sang-cerveau empêchent un grand nombre de médicaments d'atteindre le cerveau chez l'adulte. Cependant, la pharmacocinétique cérébrale de nombreux médicaments du système nerveux central (SNC) n'est pas connue chez le nouveau-né ou l'enfant.

Ce projet de recherche fondamentale d'une durée de 5 ans a pour objectif de mesurer la perméabilité sang-cerveau chez le rongeur en développement pour évaluer l'intégrité des interfaces sang-cerveau ou le passage cérébral de molécules pharmacologique dans le contexte d'un usage périnatal et pédiatrique. Les informations générées permettront d'améliorer les données disponibles sur l'usage de médicaments au sein de la population pédiatrique en réponse au Règlement pédiatrique européen n°1901/2006 visant à élargir l'offre thérapeutique en pédiatrie. Ces mesures de perméabilité font partie des prestations réalisées pour le compte de laboratoires de recherche tiers.

La procédure, de classe légère, consistera en une administration par voie intrapéritonéale sous anesthésie gazeuse, de molécules « traceurs » (marqueurs d'intégrité des interfaces sang-cerveau)

et de médicaments chez le rat ou la souris en développement afin d'évaluer leur passage cérébral. Après un temps d'exposition variant de 3 à 45 minutes, l'animal est euthanasié.

Nous estimons que 20 mesures de perméabilités seront demandées par les laboratoires tiers en 5 ans, ce qui correspondra au maximum à 360 animaux utilisés.

Remplacement : - Il n'existe pas de modèles cellulaires des interfaces sang-cerveau qui soient spécifiques de différents stades de développement. Il n'est donc actuellement pas possible de modéliser ces interfaces aux stades périnatal et postnatal *in vitro* ou *in silico*.

- La concentration intracérébrale d'un médicament dépend des caractéristiques des interfaces sang-cerveau mais aussi du métabolisme (rénal, hépatique, cérébral) du médicament, du flux sanguin et des mouvements liquidiens dans le cerveau. La résultante de ces facteurs n'est pas appréhendable *in vitro*.

Réduction : - Nous limiterons le nombre d'animaux en réalisant les expérimentations sur des animaux issus d'une même portée lors de la mesure des concentrations sanguines au cours du temps afin de limiter les variations interindividuelles.

Raffinement : - Toutes les mesures de perméabilité cérébrale seront suivies d'une euthanasie terminale. Si une molécule est susceptible d'avoir un impact douloureux sur l'animal, celui-ci sera maintenu sous anesthésie jusqu'à sa mise à mort.

15049 La myéline est une membrane produite par des cellules spécialisées, les oligodendrocytes. La gaine de myéline entoure les axones des neurones permettant l'accélération du signal nerveux et la protection des neurones. Malheureusement les oligodendrocytes sont des cellules fragiles qui peuvent mourir suite à différentes agressions, provoquant alors des lésions de démyélinisation, à l'origine de troubles fonctionnels, comme par exemple chez les patients atteints de Sclérose en Plaques. L'utilisation de modèles rongeurs a permis de montrer que les cellules souches nichées dans la zone sous-ventriculaire (SVZ) participent à la réparation des lésions péri-ventriculaires. Ces cellules souches, en condition physiologique produisent principalement des neuroblastes (jeunes neurones) qui migrent vers le bulbe olfactif pour générer de nouveaux interneurons olfactifs. Lors de lésion de démyélinisation, les cellules souches produisent des oligodendrocytes myelinisants qui participent au processus de réparation. De manière plus surprenante on observe également que les neuroblastes produits dans la SVZ, au lieu de migrer vers le bulbe olfactif et de se différencier en neurones, sont déroutés vers la lésion et changent d'identité pour devenir des oligodendrocytes capables de réparer la myéline.

Notre objectif est de décrypter les mécanismes qui contrôlent ce changement d'identité et de migration, en nous intéressant en particulier aux gènes impliqués dans la transition épithélio-mésenchymale et aux propriétés mécaniques des tissus. La transition épithélio-mésenchymale est un processus observé lors du développement embryonnaire ou encore lors de métastases cancéreuses, et qui permet le détachement et la migration des cellules par perte de polarité et d'adhésion. Il est décrit que les propriétés mécaniques des tissus sont altérées lors de démyélinisation. Nous étudierons si ces modifications mécaniques contribuent au changement d'identité des neuroblastes vers un destin oligodendrocytaire ainsi qu'à leur migration vers la lésion.

Une partie des expériences nécessaires pour adresser ces questions sera réalisée *in vitro*, par des cultures d'explants de SVZ ces explants seront prélevés sur des souris nouveau-nées, condition indispensable à la réussite de la culture. Il sera également nécessaire d'induire *in vivo* des lésions de démyélinisation expérimentalement chez la souris adulte pour ensuite identifier les gènes dont l'expression est modifiée au cours du changement d'identité et de migration. Les gènes ainsi identifiés seront insérés par électroporation dans le cerveau de souris nouveau-nées afin de vérifier que leur expression forcée est suffisante pour modifier l'identité / la migration des cellules. Le nombre de souris nécessaire est calculé à l'aide de tests statistiques afin d'obtenir des données fiables et reproductibles. Sur 5 ans, nous projetons d'utiliser un total de 318 souris, dont 183 adultes et 135 nouveau-nés. Les animaux seront surveillés quotidiennement et la douleur, si elle se présente, sera évitée au maximum par l'administration d'antalgiques (notamment en pré et post-opératoire). Les conditions d'hébergement des souris seront adaptées aux besoins physiologiques

de l'animal (en groupes sociaux, cycle jour-nuit, nourriture et boisson ad libitum) avec un enrichissement environnemental (cages contenant des barres de bois à ronger, du coton pour la nidification).

15050 Le système du complément fait référence à un ensemble de protéines sériques qui coopèrent avec l'immunité innée et adaptative pour éliminer les pathogènes. Depuis longtemps, le système du complément a été considéré comme étant une première ligne de défense immunitaire contre le cancer en s'activant à la surface des cellules tumorales. Cependant, les cellules tumorales développent des mécanismes induisant une inhibition de la voie terminale de la cascade du complément en échappant ainsi à l'effet cytotoxique médié par ce système. De récentes études ont démontré que l'activation du complément au sein du microenvironnement tumoral peut promouvoir le développement du cancer. L'activation du complément peut induire un état d'inflammation chronique, favoriser un microenvironnement immunosuppresseur, stimuler l'angiogenèse et activer des voies de signalisations favorables au développement tumoral. Les mécanismes liés à ces phénomènes sont encore mal compris. L'objectif de ce projet est d'analyser *in vitro* et *in vivo* le rôle du complément dans la progression tumorale. Nous aborderons ces questions par des études sur des modèles cellulaires *in vitro* et *in vivo* par des études de développement tumoral. Nous utiliserons des souris C57BL/6 et Balb/c wild type dans lesquelles nous injecterons des anticorps bloquant la protéine initiateur de la cascade. Ce traitement se fera en association ou pas un traitement anticancer existant dans le but d'améliorer sa réponse antitumorale. Les résultats de ce projet permettront l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques parmi les composants du système du complément. Dans la réalisation de ce projet, les procédures expérimentales ont été mises au point afin de respecter les exigences de remplacement, réduction et raffinement (3R) pour permettre une interprétation fiable des résultats dans le respect du bien-être animal. 1) Remplacement Les expériences *in vitro* utilisant des lignées cellulaires tumorales ont été réalisées et utilisées pour caractériser l'activation du complément *in vitro*. Les applications *in vitro* ne permettent pas de répondre entièrement à nos objectifs car des cellules isolées ne peuvent refléter la complexité du système immunitaire, de la vascularisation et du microenvironnement tumoral. L'expérimentation animale est ainsi nécessaire afin d'étudier ces interactions complexes au sein d'une tumeur et de chercher des cibles thérapeutiques. Les souris ont été choisies comme modèle expérimental car notre traitement reconnaît aussi bien les protéines humaines et murines. De plus, il existe différentes lignées génétiquement modifiées pour les protéines du complément. Ces modèles nous ont déjà permis de cibler les protéines d'intérêt thérapeutiques au sein du système du complément. 2) Raffinement Chaque expérimentation sera raffinée afin d'obtenir un maximum de résultats de chaque animal (taille tumorale, infiltrat immunitaire, prélèvement de la tumeur). Dans la réalisation de ce projet, les procédures expérimentales ont été mises au point afin de respecter les exigences de remplacement, réduction et raffinement (3R) pour permettre une interprétation fiable des résultats dans le respect du bien-être animal. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et adaptées en accord avec le personnel de l'animalerie (les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum; le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification et/ou tunnels en cartons). Les animaux seront observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être. De plus, le personnel impliqué dans ce projet est qualifié sur le plan technique et formé en continu sur les pratiques d'expérimentation animale. Il assure également une veille scientifique continue, évitant toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature. 3) Réduction Les expérimentations seront regroupées au maximum afin de réduire le nombre d'animaux contrôles. L'étude sera arrêtée si la procédure initiale invalide l'hypothèse de travail. Ce projet d'une durée de 5 ans nécessitera l'utilisation de 3440 souris.

15051 Chaque année, environ 14 millions de cancers sont diagnostiqués à travers le monde responsable de plus de 8 millions de décès. En France, ce sont 385 000 cancers diagnostiqués chaque année, le cancer représentant la première cause de mortalité chez les hommes et la seconde chez les femmes.

Les approches pour traiter le cancer ont profondément évolué ces dernières années et l'immuno-oncologie représente un axe thérapeutique prometteur dans ce domaine. Sa particularité n'est pas de cibler directement la tumeur comme les autres stratégies thérapeutiques, mais d'aider le système immunitaire à défendre l'organisme en reconnaissant et détruisant les cellules tumorales.

Parmi les différentes stratégies explorées en immuno-oncologie, les anticorps bi-spécifiques présentent un mode d'action intéressant. D'une part, ils lient les cellules tumorales et d'autre part, ils engagent les cellules effectrices de l'immunité, favorisant la mise en place d'une synapse cytolytique et ainsi l'élimination des cellules tumorales par les cellules immunitaires.

Le blinatumomab, un médicament aujourd'hui utilisé dans le traitement de la leucémie aiguë lymphoblastique (LAL), en est un exemple. Il s'agit d'un anticorps bi-spécifique engageant les lymphocytes T. Il se lie sélectivement au CD3 exprimé à la surface des lymphocytes T et au CD19 exprimé à la surface des cellules B malignes. Il active ainsi les lymphocytes T qui relarguent leurs enzymes protéolytiques. Toutefois, l'engagement des cellules T avec ce type de molécules montre des effets secondaires indésirables, notamment une toxicité apparente liée au relargage de certaines molécules (cytokines) propres aux cellules T.

Notre laboratoire, fort de son expertise sur les cellules NK, travaille actuellement sur le développement d'anticorps thérapeutiques équivalents, engageant non pas les lymphocytes T mais les cellules NK, cellules clés de l'immunité anti-tumorale. Les Bi-Specific NK Cell Engager (BS NKCE) se lient sélectivement à NKp46, un récepteur activateur, exprimé à la surface des cellules NK et à un antigène à la surface des cellules tumorales. Le présent projet consiste à évaluer l'efficacité d'anticorps BS NKCE dirigés contre des cellules tumorales de Myélome Multiple (MM).

Après sélection des meilleurs BS NKCE dans des tests fonctionnels *in vitro*, des tests *in vivo* permettront d'établir un classement de nos anticorps afin de déterminer notre candidat médicament. Le modèle utilisé dans notre laboratoire sera un modèle tumoral court-terme consistant à greffer les cellules tumorales en intraveineuse (IV) à la veine caudale et à injecter les anticorps en intrapéritonéal (IP) ou en IV au sinus retro-orbital. L'effet des BS NKCE sera évalué sur le nombre de cellules tumorales ayant migré dans le foie 48h plus tard. Les meilleures molécules seront ensuite évaluées dans des modèles tumoraux long-terme dans une autre institution afin de sélectionner le meilleur candidat médicament.

Le nombre total d'animaux est évalué au maximum à 1260 sur 5 ans.

Dans ce contexte, afin de respecter la règle des 3R

-remplacer et réduire le nombre nécessaire de souris a été calculé afin de couvrir les différentes études qui permettront d'investiguer les effets anti-tumoraux des BS NKCE et de fournir des résultats statistiquement significatifs. Les données obtenues sur des animaux traités pourront être comparées aux données obtenues sur des animaux ayant reçu un traitement placebo et/ou un traitement de référence et permettre ainsi l'évaluation précise de l'efficacité de nouveaux candidats médicaments.

Le remplacement des animaux est impossible à mettre en place du fait de la nécessité d'étudier l'efficacité dans un modèle *in vivo* complexe, impossible à mimer *in vitro*.

-raffiner Afin de limiter le stress, les animaux sont hébergés de 2 à 5 par cage avec 2 enrichissements de milieu, au minimum.

Dans le cas d'inflammation légère au niveau du site d'injection des cellules tumorales, un nettoyage topique sera effectué.

Les points limites relatifs à la perte de poids, à l'apparence et au comportement des animaux (prostration, poils piqués, isolement, difficultés respiratoires (dyspnée), paralysie, etc.) sont des critères qui justifieront le sacrifice des animaux.

15052 La créatine (Cr) est une molécule qui permet aux cellules cérébrales et musculaires de se constituer une réserve d'énergie. Elle passe dans le sang et rentre dans le cerveau et les muscles via le transporteur de la créatine (CRTR). Le déficit en transporteur de la créatine lié à l'X est une maladie neurologique rare dans laquelle l'absence de Cr au niveau cérébral conduit à des retards mentaux

sévères, un syndrome autistique et des crises d'épilepsie chez les enfants. Cette maladie représente 1 à 2% des retards mentaux liés à l'X. A ce jour, aucun traitement n'est disponible. En effet, les approches par supplémentation en Cr ne sont pas efficaces du fait de l'absence de passage passif de la Cr à travers la barrière hémato-encéphalique et la membrane des cellules cérébrales en l'absence de transporteurs.

Nous avons démontré que l'utilisation du Dodecyl Creatine Ester (DCE) sous forme de microémulsion permet l'amélioration des fonctions cognitives dans un modèle murin de la maladie ainsi qu'une restauration des niveaux de Cr dans différentes aires cérébrales. Pour mieux caractériser ce composé et ses effets, il est important de mettre en place des outils de suivi non invasifs et de poursuivre ces expériences dans des modèles d'étude précliniques plus pertinents.

L'objectif de ce projet est double 1/ valider une stratégie thérapeutique innovante utilisant une microémulsion de DCE administrée par voie nasale et 2/ valider des méthodes d'imagerie originales pour suivre la restauration des niveaux de créatine cérébraux *in vivo*.

En effet, la créatine étant présente de façon naturelle dans les organismes vivants (exceptés ceux qui ont la maladie du déficit en transporteur de la créatine), nous utilisons de la créatine marquée au deutérium pour la différencier de la créatine endogène. Le deutérium porté par la créatine peut ensuite être détecté par IRM. Le bénéfice de cette étude est d'intégrer, dans un projet de développement préclinique, des outils d'imagerie permettant d'étudier la pharmacologie de molécules médicamenteuses dérivées de composés endogènes, et de raffiner les protocoles expérimentaux en utilisant moins d'animaux sur un suivi longitudinal et en évitant de sacrifier des animaux. Au-delà du bénéfice pour les projets précliniques, ces nouveaux outils d'imagerie fournissent des biomarqueurs qui trouveront une place majeure dans le contexte clinique. Ces biomarqueurs pourront permettre le suivi de l'efficacité des traitements chez les patients (enfants), et aider à l'ajustement des doses thérapeutiques.

Le projet comporte deux volets

1) Une étude sur 120 souris, dans laquelle nous évaluerons l'incorporation cérébrale et périphérique du DCE par IRM dans des animaux sains et dans des animaux transgéniques modèle de la pathologie (déficient pour le transporteur de la créatine). Nous utiliserons l'imagerie IRM du deutérium pour quantifier la créatine dans le cerveau de façon répétée et non traumatique pendant et après un traitement d'un mois. Des prélèvements sanguins seront effectués en complément, après chaque examen IRM, pour mesurer la concentration plasmatique de créatine marquée.

2) Une étude sur 6 macaques sains pour démontrer l'efficacité du mode d'administration intranasale et étudier la biodistribution cérébrale du DCE par IRM. Nous utiliserons également l'imagerie IRM du deutérium pour quantifier la créatine dans le cerveau de façon répétée et non traumatique pendant et après un traitement d'un mois. Des prélèvements de sang et de liquide céphalorachidien seront effectués en complément.

Le recours à l'animal est nécessaire, car aucun milieu de culture ou système synthétique ne permet aujourd'hui d'évaluer l'effet de cette stratégie thérapeutique d'utilisation de la voie nasale pour cibler directement le cerveau (voie « nose-to-brain ») via les nerfs olfactifs et trijumeaux. Seul un modèle animal permet de tenir compte des interactions structurelles et fonctionnelles de ces nerfs et cellules, et ainsi de valider un biomarqueur d'imagerie *in vivo* et une voie d'administration originale. Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet proviendront d'élevages reconnus. Leur nombre a été réduit au minimum nécessaire afin d'obtenir des données suffisantes pour valider les nouvelles méthodologies sous différentes conditions.

Les procédures expérimentales de ce projet ont un degré de sévérité « modéré ». Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. L'application de critères d'arrêts spécifiques et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe dans un milieu enrichi permettent de garantir le bien-être des animaux.

15053 Titre du projet Etude de molécules anticancéreuses, sur des tumeurs implantées en orthotopiques, chez des souris immunocompétentes

Durée du projet 5ans

Mots clés modèles de cancer, sensibilité au traitement, nouveaux traitements

Type de recherche recherche appliquée

Buts du projet Un nombre croissant d'observations réalisées chez les patients suggèrent que le système immunitaire joue un rôle important dans certains types de traitements du cancer, notamment les immunothérapies. Ce projet vise à étudier le comportement du système immunitaire, sur des modèles tumoraux implantés en orthotopiques (càd situé à son emplacement anatomique habituel) et traités aux immunothérapies. En effet, l'étude de modèle *in vivo* en orthotopique permet de mimer au mieux le mécanisme impliqué chez l'homme et d'impliquer l'organe concerné, par rapport au modèle en sous-cutané.

L'utilisation de souris immunocompétentes (au système immunitaire intact) nous permettra de déterminer le rôle du système immunitaire dans l'effet anti et pro tumoral, dans une situation qui prend en compte l'organe impliqué. Cette étude permettra donc de comprendre de façon plus fidèle, l'impact du traitement ainsi que celui du microenvironnement immunitaire, sur les cellules tumorales implantées dans leurs organes d'origines. Retombées attendues Cette étude permettra de mettre au point de nouveaux traitements impliquant le système immunitaire.

Type d'espèces et nombres d'animaux cette étude sera réalisée sur souris immunocompétentes avec un effectif total prévu de 1431 souris

Prise en compte des 3 R a) remplacement cette étude cherche à étudier l'effet du système immunitaire sur la tumeur et doit donc être réalisée sur un organisme entier nécessitant ainsi l'utilisation du modèle animal b) réduction la mise au point du modèle sera faite sur le nombre minimal de souris nécessaire et la confirmation des résultats sera réalisée sur un nombre minimal d'animaux permettant de conclure de façon fiable statistiquement; c) raffinement Afin de respecter le bien-être animal, nous ajouterons des jeux type roues en plastique en plus du quotidien de l'animalerie. Avant la mise en place du protocole les souris seront acclimatées aux expérimentateurs du projet afin de limiter leur stress. Les animaux seront observés quotidiennement durant la durée de l'expérience afin de pouvoir réduire, supprimer ou soulager leur douleur ou leur détresse et ainsi améliorer leur bien-être.; toutes les précautions nécessaires seront prises pour détecter et minimiser la souffrance des animaux dans ce cadre, un antalgique ou analgésique sera également utilisé dans les procédures de chirurgie afin d'enrayer la douleur chez l'animal.

15054 L'objectif de ce projet est de tester de nouvelles approches thérapeutiques pour la dystrophie myotonique (DM1). La DM1 touche 1 personne sur 8000 en France. C'est une maladie dominante caractérisée par une grande variabilité dans la nature et la sévérité des symptômes. Elle se caractérise par une faiblesse musculaire, une myotonie, une cataracte précoce, des troubles cardiorespiratoires, une hypersomnolence, un hyperinsulinisme et des anomalies cognitives et du comportement. La forme la plus grave de la maladie se manifeste dès la naissance par une hypotonie, des problèmes respiratoires sévères et des défauts de succion et de déglutition et par un retard psychomoteur et un retard mental. Il n'existe à ce jour aucun traitement efficace de cette maladie.

Afin d'étudier cette maladie au cours du développement et dans différents tissus, nous avons développé un modèle de souris transgéniques porteuses du gène muté responsable de la DM1. Ces souris transgéniques reproduisent certaines caractéristiques de la maladie. Nous utiliserons notre modèle afin de tester de nouvelles approches thérapeutiques et voir si elles améliorent les symptômes observés chez la souris. Afin de limiter l'utilisation d'animaux, les outils thérapeutiques sont d'abord testés dans des modèles cellulaires afin de valider leur efficacité. Différentes doses seront ensuite testées dans des expériences pilotes avec un petit nombre d'animaux. Puis le test final sera réalisé avec des lots suffisants pour permettre d'obtenir des résultats statistiques fiables. Ces études précliniques sont indispensables avant de mettre en place les essais cliniques chez l'homme.

La majorité de nos études consiste à faire des injections chez la souris, et à tester avec des tests non invasifs la fonction musculaire et le comportement. Des études seront aussi réalisées sur des

prélèvements prélevés après mise à mort de l'animal selon les procédures standard, réalisées dans le respect de l'éthique animal. D'après nos études antérieures, nous avons pu établir, en prenant en compte la variabilité phénotypique observée dans notre modèle, le nombre minimum de souris à utiliser par lot. Plusieurs outils thérapeutiques seront testés selon les mêmes procédures. Au total nous utiliserons 1152 souris pour ces études précliniques.

Ces animaux seront hébergés tout au long de l'étude dans des cages enrichies à l'aide de coton et d'abris en carton dans un environnement exempt d'organisme pathogène. Afin de réduire la souffrance et le stress des animaux, des points limites ont été établis et un suivi du bien-être des animaux sera réalisé régulièrement.

- 15055** Afin d'étudier la biologie de virus pathogènes pour l'Homme (Polyomavirus, lésions rénales, cutanées, cancers), des anticorps seront générés en utilisant des souris femelles. Ces anticorps pourront permettre de développer des méthodes de diagnostic ou des traitements. Pour cela, 40 souris (2 souris/antigène) seront immunisées. Ainsi, nous prévoyons un total de 40 souris pour 20 antigènes sur la période de validité de la saisine (5 ans).

Ce protocole suit la règle des 3R

Réduction Le nombre de souris utilisé (N=2/ antigène) est le nombre minimum de souris requis pour l'obtention d'anticorps.

Raffinement Les conditions d'élevage des animaux seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement physique des cages d'hébergement systématique (abris en plastique rouge transparent et papier absorbant) ainsi qu'un enrichissement social (2/cage). Afin de réduire la douleur au moment de l'injection, celle-ci est réalisée avec une aiguille 26G. L'adjuvant utilisé peut induire une inflammation légère et nos 18 années d'expérience de génération d'anticorps monoclonaux chez la souris, nous montre que la seule gêne occasionnée par l'injection est un « pédalage » d'environ 10 secondes. Au vu du type d'expérience et de sa durée, il y a une très faible probabilité d'atteindre les points limites définis (prostration, pelage hérissé, déplacement difficile).

Remplacement Aucune méthode de remplacement n'existe pour l'obtention d'anticorps monoclonaux de souris, l'induction d'une réponse immunitaire *in vivo* est nécessaire pour l'obtention de ces réactifs.

- 15056** Les Troubles du Spectre Autistique (TSA) représentent un ensemble de maladies caractérisées par des problèmes de communication et d'interaction sociale. Les causes des TSA demeurent inconnues mais seraient liées à des facteurs génétiques et environnementaux. De nombreux facteurs de l'environnement (infection maternelle, surpoids, pollution,) ont été liés aux TSA sans que les mécanismes sous-jacents ne soient pour l'instant élucidés. Une hypothèse serait que des modifications du microbiote intestinal pourraient faire le lien entre facteurs de l'environnement et TSA. Le microbiote est l'ensemble des milliards de micro-organismes existant sur/dans un corps humain (majoritairement dans les intestins). Il est de nos jours considéré comme jouant un rôle déterminant dans la régulation de la communication entre le cerveau et l'intestin, et plus d'un quart des patients TSA présentent des troubles digestifs. De plus, le microbiote intestinal est sensible à la plupart des facteurs de l'environnement. Ainsi, l'hypothèse à la base de ce projet est que des modifications du microbiote intestinal maternel durant la grossesse pourrait induire des modifications dans le développement cérébral du futur enfant, participant à la mise en place des TSA.

L'objectif de ce projet est de mieux comprendre grâce à des modèles animaux de TSA comment des modifications de microbiote intestinal maternel par des facteurs de l'environnement (infections materno-foetale, exposition à des toxiques...) induisent le développement des symptômes clés de ces maladies.

Ce projet implique l'utilisation de 60 rates gestantes, 180 rats mâles et 180 rats femelles. Soit un total de 420 animaux.

Remplacement Ce type d'étude ne peut être substitué par une méthode alternative *in vitro* ou sur cellules, la difficulté étant de modéliser une pathologie humaine relativement hétérogène.

Raffinement Les mères gestantes seront en présence d'enrichissement (Sizzle Nest) et de maison.
Réduction Le nombre d'animaux est réduit au maximum tout en permettant de pouvoir observer des différences à un seuil significatif de 1 %.

Les petits issus des portées seront hébergés en groupe sociaux avec présence d'un enrichissement (tunnel et feuille de sopalin).

Toutes les stratégies d'analgésie, d'anesthésie et de soin seront mises en oeuvre pour réduire au maximum tout inconfort qui pourrait être induit par le modèle.

15057 L'ostéogénèse imparfaite (OI) est une maladie rare et génétique due à une mutation autosomale d'un des 2 gènes (COL1A1 et COL1A2) codant pour les chaînes alpha du collagène de type I, principal constituant du tissu osseux. Il existe différentes formes d'OI induites par différentes mutations génétiques ciblant le collagène de type I, qui ont été classées en différents types cliniques en fonction de leur sévérité. Quel que soit la sévérité, la pathologie est caractérisée par une réduction modérée à sévère de la quantité de matrice osseuse conduisant à des fractures osseuses répétées et des déformations osseuses.

La prise en charge de la pathologie est majoritairement orthopédique pour le traitement des fractures et une rééducation fonctionnelle pour le développement musculaire, la mobilisation et la déambulation.

Une supplémentation en Vitamine D peut également être prescrite. Dans les formes sévères, il peut être proposé des traitements médicamenteux qui visent à augmenter la densité osseuse et donc réduire les risques de fracture. Toutefois, ce sont des traitements lourds, répétés, et après une longue période de traitement, ils modifient la structure de l'os qui a une qualité anormale pouvant rendre la chirurgie orthopédique plus compliquée en raison de la qualité de l'os qui devient trop dense.

La mise au point de nouveaux traitements permettant d'agir de façon globale contre la fragilité osseuse chez l'ensemble des patients est donc une urgence médicale.

Notre société est une CRO qui mène des études pour l'industrie pharmaceutique, agroalimentaire et biotechnologique. La présente saisine est donc une saisine générique (principe validé au préalable avec les autorités compétentes) qui a donc pour but d'évaluer de nouveaux composés créés et développés par nos clients pouvant cibler un maximum d'effets pathologiques liés au développement de l'OI.

Les différents composés, en comparaison ou non à un produit de référence adapté, seront étudiés dans un modèle d'OI chez la souris mutée (hétérozygote et homozygote) pour développer une OI similaire à celle observée chez les patients développant une OI de type I (OI légère) pour la forme hétérozygote ou de type III (OI déformante) pour la forme homozygote. Les composés seront testés chez la souris et appliqués selon les schémas thérapeutiques inhérent aux composés, dans le cadre d'études menées au sein de la société. Selon notre historique, nous estimons mener 5 études par an, soit 25 études sur 5 ans. Sachant que 144 à 180 animaux sont utilisés par étude, nous estimons que 4500 souris seront utilisées sur 5 ans.

Les molécules seront évaluées sur leur efficacité contre la fragilité et les déformations osseuses.

Nos études seront planifiées pour respecter au mieux la règle des 3R pour

Remplacer l'ostéogénèse imparfaite étant une pathologie complexe, il n'existe pas à ce jour de méthodes alternatives à l'expérimentation animale pouvant reproduire cette complexité. Toutefois, nous demandons à nos clients de tester les principes actifs au préalable afin de réduire le nombre de candidats à tester *in vivo* en excluant les candidats les moins prometteurs.

Réduire pour chaque étude, le nombre d'animaux utilisé est réduit à un minimum acceptable pour l'obtention d'informations robustes et statistiquement exploitables, permettant de conclure de manière certaine, sans nécessairement réaliser une deuxième étude.

Raffiner nous mettrons en place des mesures spécifiques et adaptées aux douleurs occasionnées par la fragilité et déformation osseuse pour éviter toute souffrance inutile et prolongée les conditions d'hébergement seront optimisées (litière spécifique, facilité d'accès à l'alimentation et ajout de

nourriture appétente), des traitements antalgiques dès l'apparition des premiers signes de fracture osseuse (suivi des fractures, réalisé par radiographie), manipulation précautionneuse des animaux. Un suivi quotidien des animaux sera effectué en se focalisant sur des caractéristiques spécifiques liées à la pathologie et aux éventuels effets toxiques des composés à tester. Tout animal ayant atteint un ou plusieurs des points limites (repéré le plus précocement possible grâce à un suivi quotidien et en s'appuyant sur une grille de bien-être animal) sera euthanasié.

15058 Le but de ce projet est de comprendre les mécanismes cellulaires sous-tendant les perturbations métaboliques associées aux phases précoces de la maladie d'Alzheimer.

Les perturbations métaboliques, détectées par imagerie cérébrale chez le patient, sont un signe précoce de la maladie d'Alzheimer. L'imagerie ne permet malheureusement pas de comprendre les mécanismes sous-tendant ces perturbations, étape importante dans l'identification d'une cible thérapeutique. Dans ce but, nous souhaitons réaliser une étude chez un modèle murin de protéinopathie associée à la maladie d'Alzheimer, la souris transgénique P301S, surexprimant la forme mutée d'une protéine associée à la pathologie (la protéine tau).

Nos résultats préliminaires montrent une altération du métabolisme cellulaire chez ces souris. Le projet consiste à observer les structures cellulaires (mitochondries) sous-tendant le métabolisme par microscopie électronique, pour mettre en évidence une éventuelle perturbation structurale.

Au total, 64 souris seront utilisées dans ce projet. Pour le respect de la règle des 3R (1) En matière de réduction, la solidité de l'hypothèse de travail, s'appuyant sur des résultats préliminaires, et l'expertise reconnue de notre collaborateur dans l'étude des mitochondries par microscopie électronique, permettront de diminuer grandement le nombre d'animaux utilisés. Ainsi, 64 animaux seront nécessaires à la conduite du projet, 8 par âge étudié*sexe*phénotype soit 4 groupes à 3 semaines (avant apparition de marqueurs histopathologiques), et 4 groupes à 6 mois (apparition de marqueurs histopathologiques). 2) Les perfusions se feront sur cœur en train de s'arrêter de battre. Une sédation préalable et une couverture antalgique permettront de limiter au maximum la souffrance animale. (3) Les modèles de remplacement *in vitro* actuellement disponibles ne sont pas de bons modèles métaboliques, et ne pourraient pas être utilisés dans le cadre de cette étude.

15059 L'angiogenèse est le processus de formation de nouveaux vaisseaux sanguins, intervenant dans des étapes du développement tumoral pour assurer la croissance et l'irrigation des tumeurs. Les cellules tumorales acquièrent des propriétés invasives et quittent la tumeur primaire principalement via le long des vaisseaux sanguins ou des fibres nerveuses. Ce processus est problématique d'un point de vue clinique dans le cas du glioblastome, un cancer du système nerveux central, car il est impossible d'avoir accès aux cellules invasives afin de circonscrire la tumeur. De ce fait, les chirurgiens procèdent par une ablation de la tumeur principale et traitent par radiothérapie et chimiothérapie les patients pour essayer d'atteindre les cellules invasives. Cependant la rechute est inévitable et la survie du patient n'est donc pas réellement augmentée.

Aussi, après de nombreuses expériences préliminaires *in vitro*, et après validation de nos modèles de greffe de tumeurs, nous devons valider nos modèles d'étude de radiothérapie sur un minimum d'animaux *in vivo* pour tenir compte du contexte physiologique, du microenvironnement et répondre à la problématique des chirurgiens. Nous avons caractérisé *in vitro* l'implication de certains facteurs spécifiquement impliqués dans l'invasion, ainsi que différents récepteurs membranaires. Ces molécules et ces récepteurs semblent également moduler l'invasion des cellules *in vivo* chez des patients atteints de glioblastomes. Aussi, nous devons maintenant passer à un modèle *in vivo* chez l'animal pour tester cette hypothèse et évaluer le rôle de nos molécules et de nos récepteurs d'intérêt dans l'évolution de cette maladie afin de définir de nouvelles cibles thérapeutiques. De plus, afin de se rapprocher le plus possible des cas cliniques chez l'Homme et afin de répondre aux problématiques de rechute, nous souhaitons étudier l'impact de la radiothérapie, mais aussi de la chimiothérapie et de la résection sur le développement tumoral. Pour cela, nous utiliserons un modèle murin immunodéficient afin d'implanter des cellules tumorales humaines et ainsi reproduire au plus près les conditions de formation de ces tumeurs chez l'homme. Nous utiliserons le minimum nécessaire d'animaux pour être statistiquement significatifs et scientifiquement irréprochables.

L'ensemble des expériences impliquera différents lots d'animaux, dont le total sera de 1198. Les animaux sont produits à cet effet dans une structure agréée qui tient compte de l'éthique animale et assure l'élevage et le suivi quotidien des animaux dans les meilleures conditions de bien-être conformément à la législation et la règle des 3R. En effet, afin de réduire le nombre d'animaux, nous utiliserons tous les mâles et toutes les femelles issus des croisements. Ensuite, nous ferons des analyses bioinformatiques afin d'éviter d'utiliser un nombre trop important d'animaux. Afin de réduire les douleurs liées à la chirurgie d'implantation, des protocoles analgésiques et antalgiques seront mis en place. Un suivi quotidien des animaux permettra aussi de prévenir l'affaiblissement des animaux et prendre une décision rapide quant au sacrifice des souris. Une expérience pilote sera tout d'abord nécessaire pour l'étalonnage de l'irradiateur afin d'être certain de la dose délivrée aux animaux. En effet lors de la livraison de l'irradiateur seulement des doses théoriques sont énoncées par le fabricant et il est nécessaire de procéder à des tests sur animaux vivants sous anesthésie gazeuse en collaboration avec une équipe de radiophysiciens.

15060 Le projet présenté a vocation à répondre à une problématique de santé publique développée ci-après, à savoir, l'exposition à un facteur environnemental au cours de la grossesse, l'alcool, aux conséquences gravissimes pour la population, en France et dans le monde. Le protocole a pour objectif de valider et caractériser la valeur diagnostique de biomarqueurs d'atteintes cérébrales dans le but d'améliorer le dépistage et la prise en charge des nourrissons. En effet, dans le cadre de l'alcoolisation in utero, force est de constater que les cliniciens sont jusqu'à présent dans une impasse. Les constats sont les suivants

- les enfants atteints de troubles de l'alcoolisation fœtale (ou TCAF) sont bien plus nombreux que les enfants présentant un syndrome d'alcoolisation fœtale (ou SAF, atteinte sévère détectée à la naissance au moyen d'anomalies morphologiques),
- les troubles cliniques des enfants TCAF n'apparaissent que progressivement avec le développement. Ils échappent donc, aujourd'hui, à un diagnostic précoce qui permettrait pourtant d'améliorer la prise en charge et donc le devenir de ces enfants,
- il n'existe à ce jour aucun biomarqueur d'atteinte cérébrale lié à une alcoolisation fœtale.

Le placenta est un organe transitoire, présent au cours de la grossesse qui assure des fonctions endocrine, immunitaire et métabolique (apports en oxygène et en nutriments ainsi que l'élimination des déchets générés par le métabolisme fœtal). Le placental growth factor (PIGF) est un facteur de croissance principalement synthétisé par le placenta indispensable au développement du fœtus. Des travaux précédents ont révélé l'existence d'une interaction fonctionnelle entre le PIGF d'origine placentaire et la mise en place de la vascularisation cérébrale du fœtus. Ainsi, le dosage du PIGF placentaire a été identifié comme un biomarqueur potentiel d'atteinte neurodéveloppementale suite à une exposition à l'alcool.

Dans ce contexte d'alcoolisation in utero, il est donc important de caractériser les conséquences d'une altération de l'expression du PIGF placentaire sur le développement cérébral et les troubles comportementaux associés.

Pour ce faire, nous développerons chez la souris un modèle de sous- et sur-expression placentaire du gène PIGF par électroporation in utero. Nous utiliserons des souris de souche sauvage et des souris transgéniques exprimant au sein du cerveau une protéine fluorescente dans des cellules nerveuses (oligodendrocytes et interneurons GABA). Dans ce projet, nous avons besoin de l'expérimentation animale car nos travaux nécessitent de corréler les analyses *in vitro* aux troubles comportementaux induits par l'alcoolisation (comme décrits chez l'humain). Cette recherche nécessite des expérimentations sur 160 femelles gestantes et sur leurs descendances estimées à 1680 souriceaux sur 5 ans. Pour respecter l'éthique de l'expérimentation animale, nous appliquerons la règle des 3R (raffiner, réduire, remplacer), grâce aux stratégies suivantes

- pour raffiner, et répondre aux objectifs du projet, en tenant compte des résultats préliminaires ayant permis de raffiner les aspects méthodologiques per- et post-opératoires, les souris utilisées et nécessaires au projet seront hébergées aux normes requises et un enrichissement sera mis en

place. De plus, des mesures anesthésiques et analgésiques seront mises en œuvre et adaptées pour chaque animal et chaque procédure expérimentale,

- pour réduire au maximum le nombre d'animaux, une stratégie d'optimisation des prélèvements et d'analyses *ex vivo* sera mise en place,

- pour remplacer, dès qu'il le sera possible, des études *in vitro* sur cultures cellulaires d'oligodendrocytes et d'interneurones GABA seront développées. Cependant, l'utilisation des animaux est rendue indispensable car il n'existe pas, à ce jour, d'alternatives pour étudier l'interaction placenta/cerveau.

15061 Le nombre de fumeurs de tabac est estimé à 1,1 milliard dans le monde. Le tabac est reconnu comme l'une des drogues les plus addictives, avec plus de 70% des fumeurs qui souhaitent arrêter et moins de 10% qui y parviennent sans soutien médical. Par ailleurs, si des thérapies disponibles peuvent être un soutien dans l'initiation de l'abstinence, elles ne sont efficaces que chez un nombre limité de patients et préviennent mal la rechute du comportement. Combattre la dépendance au tabac, c'est-à-dire aider les fumeurs à stopper durablement, est un défi sociétal majeur, car le tabac est à l'origine de maladies graves et souvent fatales comme le cancer du poumon. Il est nécessaire de développer de meilleures stratégies thérapeutiques et cela dépend de notre capacité à comprendre les mécanismes de la dépendance au tabac, dans lesquels la nicotine joue un rôle central.

Il apparaît de plus en plus évident que les fumeurs n'ont pas tous le même comportement, le même type de consommation, que les mécanismes ou les motifs de leur consommation peuvent être différents. La nicotine est le principal composé addictif du tabac et provoque une dépendance physique et une dépendance psychologique. Nous avons émis l'hypothèse que le rôle et le poids des dépendances physique et psychologique dans le maintien du tabagisme, varient selon les individus.

Nous étudions la prise de nicotine chez l'animal et comparons selon les individus les effets du changement dans la dose de nicotine et de la manipulation de l'environnement.

Nous étudions les mécanismes cérébraux qui expliquent ces différences individuelles au travers d'enregistrements de l'activité cérébrale ou la manipulation de cette activité par des agents pharmacologiques ou des méthodes d'optique.

Nous minimisons les contraintes liées à ce type d'études (chirurgies cérébrales vasculaires, hébergement individuel) en portant une attention particulière à la mise en pratique des principes éthiques fondamentaux (principe des 3R Remplacement, Réduction, Raffinement).

Remplacement : Seul le modèle animal permet d'interroger les mécanismes neurobiologiques difficilement accessibles chez l'homme. De plus, l'étude du comportement addictif ne peut se réduire à la simple étude de l'effet de la drogue. Ce comportement met en jeu des mécanismes psychopharmacologiques complexes (conditionnement, perte de contrôle, impulsivité, compulsivité) qui ne peuvent pas être appréhendés par des modèles *ex vivo*.

Dans ce projet nous utiliserons un nombre total de 576 animaux, des rats non-consanguins, sur une période de cinq ans. Le rongeur est en effet utilisé depuis 1960 pour modéliser la prise de drogue au travers de la procédure d'auto-administration intraveineuse.

Réduction : L'utilisation d'un trop grand nombre d'animaux est contraire à l'éthique, mais si trop peu d'animaux sont utilisés, l'expérience peut manquer de puissance statistique.

Deux approches peuvent être appliquées selon les conditions. Initialement, lorsque l'effet de la manipulation ne peut pas être anticipé, notamment dans les études manipulant l'activité cérébrale, nous ajustons le nombre d'animaux pour que le nombre final analysé soit de 10-12 animaux par groupe. Par la suite, lorsque nous disposons de suffisamment d'informations sur les variables de réponses, nous procédons à des analyses de puissance afin de déterminer le nombre adapté de sujets qui permettra d'affirmer que le résultat statistique obtenu est fiable.

Raffinement : Pour définir les dommages et contraintes subis par l'animal, nous avons établi une grille d'évaluation clinique et de surveillance.

Pour réduire au maximum les conséquences de ces dommages, nous mettrons en œuvre les moyens suivants : enrichissement de l'environnement, soins pré-, per- et post-opératoires, administration d'analgésiques, manipulation quotidienne après l'intervention chirurgicale, phases d'habituation aux tests comportementaux, manipulation et examen bi-quotidiens avant et après la session comportementale, définition de points limites suffisamment précoces et mise en place de critères d'arrêt.

L'état de santé et l'attitude générale des animaux seront donc évalués individuellement deux fois par jour. L'animal sera pesé une fois par semaine.

15062 La grande majorité des thérapies proposées en oncologie reposent principalement sur le ciblage des cellules tumorales. De nouvelles approches proposent des combinaisons thérapeutiques ciblant à la fois les cellules cancéreuses comme les inhibiteurs des tyrosine kinases (TKI) en association avec des molécules ciblant les cellules immunitaires du microenvironnement. En effet la stimulation de l'immunité antitumorale endogène obtenue par exemple par l'utilisation des anticorps interférant avec les points de contrôle immunitaires des cellules T (PD1 et CTLA-4) a donné des résultats cliniques très encourageants avec parfois dans certains cas une disparition complète, des tumeurs et de leurs métastases. Cependant, moins de 40% des patients répondent à ces nouveaux traitements. Afin d'améliorer la prise en charge des cancers, il apparaît primordial de mettre au point de nouvelles immunothérapies en identifiant et validant de nouvelles cibles thérapeutiques par des études précliniques. Dans cet esprit, notre équipe a développé des anticorps qui ciblent à la fois les cellules tumorales et les cellules immunitaires du microenvironnement. Ces anticorps, dont l'action antitumorale a été explorée *in vitro* avec succès, nécessitent maintenant une étape de validation *in vivo*. Cette étape consiste à étudier les effets de nos anticorps dans un modèle préclinique capable de mimer la réponse thérapeutique chez l'homme et, idéalement, les mécanismes prédictifs de résistance et d'interaction avec le système immunitaire. Nous concentrerons nos efforts sur l'établissement de modèles tumoraux pour l'évaluation de l'efficacité anti-tumorale de ces anticorps. Notre projet comporte deux parties : Etude pharmacocinétique des anticorps puis évaluation de l'efficacité des anticorps dans des modèles tumoraux.

Les interactions complexes entre le système immunitaire et les différents effecteurs intervenant dans le cancer ne peuvent actuellement pas être modélisés en dehors d'un organisme vivant entier.

L'évaluation préclinique de nos anticorps seuls ou en association avec d'autres thérapies ciblées (chimiothérapies, anti-angiogéniques, anti-check-points inhibiteurs) nécessite l'utilisation de modèles murins adaptés à ces évaluations. En effet, notre projet s'inscrit dans la continuité d'études *in vitro* et nécessite une étape indispensable *in vivo* afin d'étudier les effets de nos anticorps dans un modèle préclinique capable de mimer la réponse thérapeutique chez l'homme et idéalement, les mécanismes prédictifs de résistance et d'interaction avec le système immunitaire. Le recours à des animaux vivants est donc incontournable.

Les contraintes pour les animaux dans ce projet seront des études de pharmacocinétiques des anticorps (prises de sang) et l'implantation de tumeurs par voie sous-cutanée pour la création des modèles et les tests thérapeutiques.

Le projet a été conçu et construit par des étapes successives dans une optique d'efficacité et d'utilisation rationnelle, raffinée et limitée du nombre d'animaux. Pour cela, nous commencerons par choisir et valider avec soin les modèles tumoraux les mieux adaptés à notre projet. L'étude pharmacologique et d'évaluation d'efficacité des anticorps ne sera réalisée qu'après validation des modèles tumoraux et obtention de résultats probants de l'étude PK/PD. Nous ferons en sorte de regrouper au maximum les conditions à tester afin de réduire au minimum le nombre d'animaux. L'expérience de notre équipe dans l'utilisation de ces modèles, la multiplicité des paramètres mesurés, l'utilisation des méthodes statistiques adaptées nous permettront une exploitation maximale des données obtenues par expérience afin de réduire le nombre d'animaux à utiliser (1344 souris pour les 5 ans que durera ce projet). Toutes les procédures seront effectuées sous anesthésie locale ou générale. Nous aurons recours autant que possible à des techniques d'imagerie non invasive pour le suivi rapproché des animaux afin de réduire le nombre de souris utilisées et aussi privilégier leur bien-être (raffinement et réduction). Une attention toute particulière

sera également portée sur le bien-être des animaux par une surveillance journalière qui sera assurée par le personnel de l'animalerie, en complément à celle des expérimentateurs. Pour les souris présentant une souffrance et/ou une douleur mise en évidence par une modification comportementale et/ou physique, des points limite stricts seront appliqués pour arrêter la procédure expérimentale.

15063 L'hyperplasie bénigne de la prostate (HBP) est une tumeur bénigne qui touche 50% des hommes de 50 ans. L'HBP cause des troubles urinaires qui altèrent considérablement leur confort de vie. Les thérapies médicamenteuses (anti-androgènes, alpha-bloquant) traitent essentiellement les symptômes et font rapidement face à un épuisement d'effet. L'ablation chirurgicale de la tumeur conduit à des effets secondaires très gênants (troubles sexuels). Il n'existe donc actuellement aucun traitement satisfaisant de l'HBP alors que sa prévalence est appelée à augmenter avec le vieillissement de la population.

Notre programme de recherche vise à identifier de nouveaux mécanismes de progression de l'HBP afin de définir de nouvelles thérapeutiques innovantes ciblant ces mécanismes (stress oxydant, autophagie, inflammation, etc.). Les molécules que nous testerons auront été préalablement validées pour leur capacité à inhiber l'un de ces nouveaux mécanismes dans des modèles précliniques *in vitro* ou *in vivo*, voire chez l'Homme (repositionnement de molécules déjà utilisées pour d'autres indications).

La pathologie HBP impliquant des interactions fonctionnelles complexes entre plusieurs types cellulaires, l'utilisation de modèles animaux est incontournable en complément des modèles *in vitro*. Nous disposons d'un modèle de souris transgéniques développant une HBP similaire à l'HBP humaine. Ce modèle unique sera utilisé pour toute l'étude afin de déterminer la capacité thérapeutique des molécules testées. Les procédures et les analyses phénotypiques post-mortem sont parfaitement établies au laboratoire.

Les molécules seront administrées quotidiennement par voie orale, sous-cutanée ou intrapéritonéale en respectant les recommandations en vigueur concernant les volumes tolérés. Les doses seront choisies selon les données de toxicité connues (littérature). Pour chaque molécule, une étude pharmacocinétique (0-24 h, 12 souris sauvages) et une étude de tolérance (5 jours, 6 souris sauvages) seront réalisées. Pour l'étude d'efficacité, chaque traitement sera administré pendant un à deux mois à un groupe de 12 souris transgéniques (robustesse statistique). Une étude d'efficacité type comprendra six groupes de traitement incluant excipient, molécule de référence et molécule d'intérêt (dose-réponse et/ou combinaison avec d'autres principes actifs). L'ensemble des animaux qui seront utilisés pour la mise en œuvre de ce projet a été évalué à 540 sur 5 ans.

Différentes mesures seront prises afin de réduire le nombre d'animaux utilisés au strict nécessaire i) les études pharmacocinétique et de tolérance ne seront pas réalisées si ces données sont disponibles dans la littérature ii) le nombre de groupes sera réduit si une seule dose de la molécule suffit à valider son effet thérapeutique iii) les analyses de plusieurs molécules seront si possible combinées dans la même étude (les mêmes groupes contrôles serviront pour deux molécules) iv) la prostate d'un même animal sera utilisée pour la mesure de nombreux paramètres expérimentaux.

Le phénotype de nos souris est non-dommageable. Certains traitements peuvent néanmoins apporter de l'inconfort à l'animal. Nous avons donc établi une liste de points limites au-delà desquels les traitements seraient suspendus et la mise à mort anticipée de l'animal envisagée. Afin de réduire le stress des souris, les traitements quotidiens sont réalisés par le même expérimentateur, les cages bénéficient d'un enrichissement adéquat (coton et maisons en carton) et les mâles d'une même fratrie (pour limiter l'agressivité) seront gardés ensemble.

Notre objectif est de valider dans notre modèle unique d'HBP chez la souris l'efficacité de molécules thérapeutiques ciblant de nouveaux mécanismes pathologiques. Tout résultat probant serait un élément important pour proposer leur utilisation chez les patients souffrant d'une HBP.

15064 L'artérite à cellules géantes (ACG) correspond à une inflammation des gros vaisseaux de l'organisme touchant les personnes âgées de plus de 50 ans. Il s'agit de la plus fréquente des

causes d'inflammation des vaisseaux chez l'adulte, et touche environ 10/100 000 habitants de plus de 55 ans par an en France. Elle se manifeste principalement par des maux de tête, des douleurs à la mâchoire, des troubles de la vue ou des douleurs des épaules et des hanches. L'ACG peut aussi se compliquer d'inflammation de l'aorte (aortite) dans 80% des cas et d'anévrismes (c'est-à-dire une dilatation anormale de l'aorte), jusqu'à 20% à 5 ans. Le traitement repose sur la cortisone, mais environ 50% des patients vont faire au moins 1 rechute, et jusqu'à 86% vont avoir des effets secondaires liés au traitement. De plus, la cortisone semble inefficace pour prévenir l'apparition d'anévrisme aortique, qui fait suite à l'inflammation de l'aorte. Les traitements ciblant l'interleukine (IL)-6 permettent de traiter certains malades réfractaires, mais représentent un traitement suspensif (c'est à dire qu'à l'arrêt du traitement, la maladie récidive) et ne semblent pas non plus prévenir l'apparition d'anévrisme aortique.

L'IL-1 est un médiateur responsable d'inflammation, sécrété par de nombreuses cellules du système immunitaire. Plusieurs données sont en faveur de l'implication de l'IL-1 dans la physiopathologie de l'ACG, notamment le fait qu'une variation dans le gène codant pour son inhibiteur naturel est un facteur de susceptibilité de la maladie, et que le traitement a été essayé avec succès chez des patients atteints d'ACG réfractaires aux autres traitements. De plus, les souris BALB/c IL1rn^{-/-}, mutée au niveau du gène codant pour l'inhibiteur naturel de l'IL-1, développent dans 50% des cas à 12 semaines une aortite, dont les caractéristiques anatomopathologiques ressemblent à celles décrites dans l'ACG. Ce modèle apparaît être un modèle idéal pour étudier la physiopathologie de l'aortite inflammatoire, et notamment du rôle de l'IL-1 et de l'efficacité d'un anti-IL-1 sur la prévention de cette aortite.

Notre objectif est de caractériser ce modèle d'aortite inflammatoire par dosage sanguin de cytokines inflammatoires, réalisation d'une tomographie par émission optique couplée à une imagerie par résonance magnétique et cytométrie de flux et immunohistochimie de l'aorte, et d'évaluer l'efficacité de différents traitements sur la survenue de cette aortite, administrés grâce à une pompe implantée en sous-cutané à 8 semaines sous anesthésie générale. Nous utiliserons la souche de souris BALB/c IL1rn^{-/-}, dont le gène codant pour l'inhibiteur naturel de l'IL-1 est muté, et nous comparerons les données obtenues à celles obtenues chez des souris contrôles BALB/c.

Dans cette étude, nous utiliserons 5 groupes de souris (nombre minimal afin de pouvoir comparer l'efficacité de l'anti-IL-1) traitement par anti-IL-1, traitement par anti-IL-6, traitement par bisphosphonates, traitement par corticoïdes, groupe contrôle. Dans un souci de réduire le nombre d'animaux, nous utiliserons 30 souris par groupe, ce qui représente le nombre minimal afin d'obtenir des résultats statistiquement fiables (puissance 80%, risque α 5%). De plus, 30 souris seront utilisées afin de caractériser ce modèle et mettre au point les techniques, soit un total de 180 souris.

Ce travail nécessite l'utilisation de souris, le recours à des modèles alternatifs n'étant pas opportun car les prélèvements humains d'aorte inflammatoire au cours de l'ACG sont exceptionnels. Nous nous intéressons à un modèle d'aortite inflammatoire et particulièrement au rôle de l'IL-1 dans sa survenue, qu'on ne peut étudier uniquement que grâce à la souris mutée pour ce gène. De plus le remplacement n'est pas possible dans cette étude puisque l'aortite ne peut être correctement étudiée que sur l'aorte en entier. Enfin, il n'existe pas de lignée cellulaire d'aorte appropriée.

Concernant le raffinement des conditions expérimentales, les animaux seront hébergés dans des cages standards aux normes européennes (type IV). La nourriture, la boisson et la litière seront changées une fois par semaine. La litière de peuplier "aspen small", plus douce et variée pour les animaux, permet de réduire le niveau de stress et possède les avantages d'être peu poussiéreuse et moins allergisante que le résineux. Les animaux seront hébergés par groupe de 5 afin de conserver les interactions sociales. La litière sera enrichie avec de la litière cellulose Alpha Dry permettant la confection de nid, ainsi qu'une cabane en carton leur permettant ainsi de se cacher durant la période d'exposition à la lumière. A la suite des procédures, la perte de poids (plus de 10% de perte par rapport au poids avant chirurgie), l'aspect des poils et le comportement de l'animal par rapport à ses autres congénères seront surveillés étroitement (matin et soir) pendant 7 jours par du personnel formé et expérimenté. Nous suivrons les indications de recommandations de la "Mouse Grimace Scale" dès les premières heures post-procédure pour effectuer une analyse de l'état de la santé de l'animal. Si un animal a un score strictement supérieur à 4 en suivant cette

échelle, la procédure de mise à mort sera effectuée. L'analgésie post-opératoire sera assurée par une injection de 0,5 mg/kg de méloxicam et par une injection de buprénorphine à la dose de 0,05 mg/kg. Elle sera ensuite relayée par une injection sous-cutanée de buprénorphine à la dose de 0,05 mg/kg toutes les 12 heures pendant 3 jours.

15065 La NASH (stéatohépatite non alcoolique) est une pathologie fréquente dans le monde occidental. Elle se caractérise par une accumulation de graisses dans le foie accompagnée d'une inflammation qui entraîne la mort des cellules, et peut être associée ou non à une fibrose pouvant évoluer en cirrhose et en hépatocarcinome. Elle est la résultante de l'association de plusieurs dysfonctionnements qui constituent le syndrome métabolique parmi lesquels les mécanismes déclencheurs sont pour la plupart identifiées (insulinorésistance, diabète de type 2, dyslipidémie et obésité).

L'évolution de la pathologie est lente et insidieuse, à ce jour elle ne peut être diagnostiquée chez l'homme que par la réalisation de biopsie hépatique. Au laboratoire, les modèles expérimentaux reproduisent chez l'animal la pathologie plus rapidement mais l'évaluation de l'efficacité des nouvelles molécules fait aussi appel à l'analyse histologique post-mortem.

Cette pathologie étant multifactorielle, les approches thérapeutiques sont nombreuses, cependant à ce jour, aucune molécule n'a reçu d'autorisation de mise sur le marché pour le traitement de la NASH.

Afin d'étudier nos hypothèses lors du développement de nos molécules, il nous sera inévitable d'avoir recours à des modèles animaux puisque les méthodes alternatives ne permettent pas de reproduire la pathologie telle que présente chez l'Homme. En effet, l'administration des composés dans le contexte d'un animal vivant permet d'évaluer la réelle efficacité des composés dans un système biologique complexe et « global ». Pour restreindre le nombre d'animaux utilisés, et ainsi répondre à la règle des 3R's, nous ne procédons aux évaluations *in vivo* que des molécules ayant franchi avec succès les phases de sélection effectuées sur des modèles acellulaires et cellulaires.

Pour développer de nouvelles thérapies nous devons avoir recours à des modèles expérimentaux divers. Dans notre projet, nous ferons appel à des animaux à fond génétique sain comme par exemple les C57Bl/6, C3H, ou Sprague-Dawley. Nous les soumettrons à des régimes alimentaires standards ou spéciaux (enrichis en gras, en cholestérol et en sucre) qui permettront d'installer la pathologie. Le régime enrichi en gras et sucre va permettre de mimer le régime « fast-food » associé à la progression de la pathologie chez l'homme. Cependant, il a été démontré que certains animaux sont non répondant aux régimes « spéciaux » (le pourcentage dépend de la souche et du régime utilisé) et ne développent donc pas de NASH. C'est pourquoi il est important de pouvoir exclure ces animaux avant initiation des traitements avec une molécule d'intérêt afin de ne pas biaiser les résultats (faux positifs).

La réalisation d'une biopsie hépatique est une technique qui permet de sélectionner les animaux répondants au régime et ainsi de commencer le traitement sur des animaux ayant atteint un stade de la pathologie avancée. Ceci permettra de réduire l'hétérogénéité des résultats. De plus, le fait de connaître le meilleur moment pour commencer le traitement évite la répétition de la procédure et ainsi permet de réduire le nombre d'animaux utilisés ce qui répond à la règle des 3R's. Nous avons fait appel à une consultante extérieure qui nous aidera à la mise en place et à l'exécution de la meilleure chirurgie possible dans des conditions d'asepsie, d'anesthésie/analgésie et de soins postopératoires optimaux.

Les procédures utilisées sont adaptées afin d'optimiser le nombre d'animaux à engager dans les protocoles expérimentaux. En effet, en respect de la règle du raffinement, un ajustement strict du nombre d'animaux est effectué afin de maximiser les informations recueillies lors de la caractérisation et de la détermination des doses thérapeutiques optimales des molécules d'intérêt. De plus, il ne sera effectué sur les animaux que le nombre strict de prélèvements sanguins, en volume et en fréquence, compatibles avec la physiologie de l'animal. Les animaux seront sous observation quotidienne et aucun animal en détresse ou en souffrance ne sera maintenu dans cet état, il serait euthanasié par une méthode humaine adaptée le cas échéant.

Nous prévoyons l'emploi de 3 230 animaux (souris ou rat) au cours de la durée couverte par ce projet.

15066 Le but de nos travaux est d'identifier des peptides ou des nutriments capables de diminuer le risque d'ostéoporose. Pour assurer ses fonctions, le tissu osseux est continuellement renouvelé par un processus de remodelage assuré par deux types de cellules les ostéoclastes qui résorbent (détruisent progressivement) la matrice osseuse et les ostéoblastes qui synthétisent une nouvelle matrice. L'ostéoporose est définie par l'Organisation Mondiale de la Santé comme « Une maladie caractérisée par une faible masse osseuse et une détérioration de la microarchitecture du tissu osseux, provoquant une fragilité osseuse et une augmentation du risque de fracture ». Elle est due à un déséquilibre entre la formation osseuse, assurée par les ostéoblastes, et la résorption osseuse, réalisée par les ostéoclastes. Ce déséquilibre provient du vieillissement osseux « physiologique » mais peut être accéléré par la dénutrition ainsi qu'après la ménopause avec la réduction des œstrogènes, les œstrogènes étant des régulateurs hormonaux principaux du remodelage osseux. L'arrêt des fonctions ovariennes conduit à une réduction des taux d'œstrogènes, ce qui provoque la mort cellulaire des ostéoblastes et une augmentation de la durée de vie des ostéoclastes ce qui favorise la résorption osseuse. Nous faisons l'hypothèse qu'en situation de dénutrition protéique nous pouvons diminuer le risque d'ostéoporose en augmentant l'apport en certains peptides (fragments de protéine).

Nos précédents travaux ont montré qu'il est possible d'induire une ostéoporose en réduisant l'apport protéique. En effet, lorsque les souris sont soumises à des régimes à faible teneur en protéine, incluant seulement 6% de l'énergie sous forme de protéine de soja, nous observons une perte de densité minérale osseuse, une réduction de la longueur des fémurs et une altération de la microarchitecture osseuse. Afin de mimer la situation de nombreuses personnes âgées dénutries nous couplerons la réduction de l'apport protéique à une ovariectomie (ablation des ovaires) qui est un modèle classique d'ostéoporose induit par l'absence d'œstrogènes. Sur ce modèle d'ostéoporose induite chez la souris, nous testerons l'impact de régime à faible teneur de protéine incluant différents peptides. Nous possédons déjà des données concernant les effets des régimes incluant seulement 6% de protéine de soja sur la composition corporelle et la densité minérale osseuse des souris. Les peptides testés sur notre modèle animal ont été pour la plupart, sélectionnés à l'aide d'un modèle *in vitro* (cultures primaires de cellules osseuses) qui nous ont permis de démontrer l'efficacité des peptides à induire la différenciation des ostéoblastes (augmentation de la synthèse de collagène) et ainsi de diminuer le nombre d'animaux utilisés.

Dans la mesure où le but final du projet est la mise au point d'un produit qui sera ingéré à dose nutritionnelle chez l'Homme, il convient de tester l'effet des peptides sélectionnés sur un modèle animal. Ces études permettront de vérifier que l'ingestion des peptides choisis est capable de stimuler *in vivo* l'activité et la différenciation des ostéoblastes et de réduire l'ostéoporose. Nous testerons 6 peptides (peptides courts de 2 à 4 acides aminés) à différentes concentrations afin de définir les conditions optimales. L'étude d'un peptide inclura 9 groupes de 12 animaux soit 108 animaux et un total de 648 souris sur 5 ans.

Ces expériences seront menées dans le respect du bien-être animal. Les procédures stressantes seront limitées au maximum. Le nombre de souris par groupe sera de 12 souris, c'est le minimum exigé pour l'analyse statistique des paramètres mesurés et nous avons veillé à nous limiter aux seules expériences considérées comme indispensables. Les régimes offerts sont appétents et ne provoqueront pas de stress ni de malaise aux animaux. Certaines des procédures utilisées au cours de cette étude induisent un stress modéré le logement en cages individuelles (afin de pallier cet isolement les cages ont des parois transparentes ce qui rend possible les interactions visuelles, auditives et olfactives avec les congénères et le milieu est enrichi au moyen de maisonnette). L'ablation des ovaires est réalisée sous anesthésie gazeuse (l'utilisation de ce système d'anesthésie permet aux animaux de récupérer rapidement et le taux de survie est de 100%) et un traitement analgésique (morphinique) est prévu avant et après l'opération afin de limiter la douleur et sera pratiquée par des expérimentateurs chevronnés. Le protocole prévoit également la mesure

du poids et de la prise alimentaire des souris trois fois par semaine, ce qui permet aux expérimentateurs de suivre l'évolution de l'état sanitaire des souris.

Au cours de l'expérimentation nous évaluerons la densité minérale osseuse et la composition corporelle des souris. Un prélèvement de sang à la queue par des personnes expérimentées sera effectué à mi-parcours (6 semaines) afin d'évaluer les marqueurs du métabolisme osseux. A la fin de l'expérimentation les animaux seront euthanasiés afin d'analyser les répercussions des régimes sur la qualité des os. Les résultats de ce projet de recherche pourront permettre de développer de nouveaux compléments alimentaires appropriés pour le maintien de la santé osseuse chez les populations souffrant d'ostéoporose.

15067 L'insuffisance cardiaque « IC » est un syndrome qui se caractérise par l'incapacité du cœur à fournir un débit sanguin nécessaire au bon fonctionnement des organes. Il s'agit d'une maladie grave qui nécessite une prise en charge rapide.

Les patients insuffisants cardiaques souffrent d'une atteinte de la fonction cardiaque et développent plusieurs signes et symptômes caractéristiques de la pathologie (essoufflement, œdème pulmonaire et périphérique).

A l'heure actuelle deux formes majeures d'insuffisance cardiaque sont reconnues par la Société Européenne de Cardiologie et l'Association Américaine de Cardiologie et classées selon le niveau d'altération de la fraction d'éjection (paramètre mesuré par échographie qui permet de quantifier le pourcentage de sang éjecté à chaque contraction cardiaque)

- L'IC chronique à fraction d'éjection réduite (HF_rEF) caractérisée par une altération de la capacité du cœur à se contracter. Ce type d'IC survient, dans la plupart des cas, suite à un infarctus du myocarde. 50% des patients insuffisants cardiaques souffrent d'une HF_rEF. A l'heure actuelle, ce type d'IC est bien pris en charge et plusieurs médicaments ont déjà prouvé leur efficacité chez les patients.

- L'IC chronique à fraction d'éjection préservée (HF_pEF) caractérisée par une altération du remplissage et de relaxation (altération de la fonction diastolique période durant laquelle le cœur se remplit) en présence d'une fonction contractile normale du muscle cardiaque. Parmi les patients souffrant d'IC, la proportion de ceux atteints d'une HF_pEF ne cesse d'augmenter (environ 50% des patients insuffisants cardiaques). De plus les patients atteints de cette pathologie présentent, dans la majorité des cas, des facteurs de risques (hypertension, diabète, obésité,..) qui rendent la compréhension de la physiopathologie de cette forme d'insuffisance cardiaque plus complexe. A l'heure actuelle, aucun traitement n'a montré une efficacité chez le patient HF_pEF. Les patients souffrant de ce type de pathologies constituent une population très hétérogène, où les facteurs de risques (diabète, hypertension..) jouent un rôle très important dans la progression et l'aggravation de la pathologie.

L'IC est un syndrome qui peut être étudié au laboratoire grâce à des modèles précliniques *in vivo* et ainsi permettre la découverte de nouvelles thérapies. Actuellement, plusieurs modèles récapitulant la physiopathologie de l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection réduite (modèle d'ischémie cardiaque permanente, modèle d'ischémie-reperfusion) sont mis en place, caractérisés et validés au sein de notre département. Néanmoins concernant l'IC à fraction d'éjection préservée, le manque de traitement peut être expliqué en partie par le manque de modèles animaux adéquats récapitulant la physiopathologie humaine. A l'heure actuelle plusieurs modèles sont décrits dans la littérature comme étant des modèles d'IC à fraction d'éjection préservée néanmoins ces modèles ne manifestent pas l'ensemble des signes et symptômes requis de l'insuffisance cardiaque pour être considérés comme des modèles transposables à l'homme.

Ce projet vise à développer 2 modèles expérimentaux consistant à traiter des rats génétiquement altérés diabétiques ou présentant un syndrome métabolique (état de prédiabète et hypertension) par une molécule chimique, le L-NAME, pendant 3 mois. Le L-NAME doit induire une importante dysfonction endothéliale en provoquant une rigidité des vaisseaux.

Les animaux soumis pendant 3 mois au L-NAME vont développer une importante rigidité artérielle (induisant elle-même une hypertension), une augmentation de la masse du muscle cardiaque et une fibrose. L'ensemble de ces modifications va mener à une altération de la fonction cardiaque. Ces résultats laissent présager que ces 2 modèles pourront constituer de bons modèles expérimentaux d'HFpEF qui recapitulent la pathologie humaine en termes de multiplicité des facteurs de risque (Diabète ou Prédiabète + hypertension).

Le but de ce projet consiste donc à mettre en place ces deux modèles d'Insuffisance Cardiaque à fraction d'éjection préservée afin d'étudier les modifications moléculaires, cellulaires et fonctionnelles à l'origine de ce type de syndrome et faire émerger des cibles potentielles pour le traitement.

La caractérisation de ces deux modèles se fera sur la base des évaluations échocardiographiques afin d'étudier la fonction cardiaque dans sa globalité, de quantification de biomarqueurs circulants et tissulaires pour mieux comprendre la physiopathologie du modèle, et d'évaluation de l'hémodynamie cardiaque pour étudier des propriétés spécifiques au muscle cardiaque qu'on ne pourra pas explorer par échocardiographie. Cette caractérisation permettra ensuite de faire émerger des cibles potentielles pour le traitement de l' HFpEF.

Pour le respect des règles des 3R nous avons prévu

Pour raffiner : L'état général des rats sera suivi quotidiennement afin de détecter et d'anticiper tout signe de souffrance.

Les rats seront également maintenus par deux en cages enrichies d'éléments visant à leur permettre d'exprimer leurs instincts (comme des morceaux de bois à ronger) ainsi qu'avec une litière spécifique pour rat diabétique.

Les évaluations par échographie sont non invasives et permettent d'évaluer facilement l'avancement de la pathologie chez l'animal anesthésié ponctuellement puis remis dans ses conditions d'hébergement habituelles sans incidence de stress ou souffrance.

Pour réduire Le nombre d'animaux prévu par groupe sera déterminé en collaboration avec notre département de biostatistiques sur la base d'une première étude pilote.

Pour remplacer L'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée est un syndrome multifactoriel où les patients présentent un ou plusieurs facteurs de risque en grande partie responsables de la progression et du développement de l'insuffisance cardiaque. Ce pourquoi le recours à l'animal vivant présentant de tels facteurs de comorbidité est indispensable.

Les modèles développés dans ce projet n'ont pas comme but d'être utilisés pour des études d'efficacité de nouveaux candidats médicaments. Ces modèles s'inscrivent dans une recherche purement exploratoire de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement de l'insuffisance cardiaque. Dans ce projet nous estimons nécessaire l'utilisation de 700 rats pour une durée de 5 ans. Environ 10 études seront réalisées durant les 5 ans du projet, une étude de validation du modèle et d'exploration fonctionnelle et 9 autres études dont le but est de focaliser sur certains mécanismes physiologiques et physiopathologiques d'intérêts afin de faire émerger à chaque étude 1 ou plusieurs cibles d'intérêts pour le traitement de l'insuffisance cardiaque (ceci via des explorations réalisées *in vivo*, *ex vivo* ou *in vitro* sur ces 2 modèles).

15068 Au cours du développement de tout nouveau médicament, des études sont requises par les autorités pour évaluer sa sécurité d'utilisation chez l'Homme, rechercher les mécanismes liés à une toxicité éventuelle et proposer des mesures d'accompagnement pour renforcer le bénéfice/risque à utiliser ces médicaments. Le métabolisme des médicaments et le risque d'hépatotoxicité sont des facteurs majeurs de prédiction du risque potentiel chez l'Homme lors du développement des médicaments. Ce projet a pour objectif d'améliorer la prédiction de ces 2 facteurs en utilisant de nouveaux modèles « humanisés ». A ce jour, même s'il existe de nombreux modèles *silico*, *vitro* et *vivo*, qui permettent déjà de réduire le risque d'hépatotoxicité, il reste encore des risques non prédictibles et il est nécessaire de trouver de nouveaux modèles. Les modèles de rongeurs dits «

humanisés » (en utilisant des cellules de foie humain) constituent un espoir important. Plusieurs modèles différents de souris pourront être utilisés pour trouver le modèle le plus prédictif.

Les études incluses dans ce projet ont une durée de 1 jour à 4 semaines selon le mode d'administration prévu chez l'Homme. Les voies d'administrations (orale ou parentérale) sont celles prévues chez l'Homme. Des examens réguliers à l'aide de matériel adapté incluent observations cliniques, prise de température corporelle (mesure rectale), prélèvements de sang pour vérifier les paramètres hémato-biochimiques, métaboliques et vérifier le passage du médicament dans le sang, collecte d'urines et de fèces (en utilisant les méthodes les moins contraignantes possibles pour l'animal (exemple du microsampling), conformément au principe des 3Rs. Les organes cibles sont également recherchés pour permettre de proposer des méthodes de suivi des patients et s'assurer que le traitement n'a pas, chez eux, d'effet adverse sur les organes cibles identifiés.

Le nombre d'animaux utilisé dans ces études est choisi en fonction de la variabilité des paramètres examinés afin de permettre d'atteindre les objectifs de l'étude. Le degré de sévérité de ces études ne doit pas dépasser le stade modéré des grilles de points-limites, adaptées aux modèles, sont appliquées, sous contrôle d'un vétérinaire, afin de prendre des décisions très rapidement chaque fois que cela s'avère nécessaire et éviter ainsi toute souffrance inutile. Toutes mesures nécessaires à l'amélioration du bien-être des animaux sont prises.

Selon le nombre de candidats médicaments sélectionnés via des tests *silico* et *vitro*, qui atteindront l'étape « *in vivo* » et pour lesquels des signes d'alerte auront préalablement été identifiés, un maximum de 150 souris sera utilisé chaque année.

Le bénéfice apporté par ce projet est de permettre d'optimiser le développement de candidats médicaments en améliorant précocement la prédiction du métabolisme et de leur toxicité hépatique éventuelle chez l'Homme, diminuant ainsi le risque d'hépatotoxicité médicamenteuse.

15069 La NASH (stéatohépatite non alcoolique) est une pathologie fréquente dans le monde occidental. Elle se caractérise par une accumulation de graisses dans le foie accompagnée d'une inflammation qui entraîne la mort des cellules, et peut être associée ou non à une fibrose pouvant évoluer en cirrhose et en hépatocarcinome. Elle est la résultante de l'association de plusieurs dysfonctionnements qui constituent le syndrome métabolique parmi lesquels les mécanismes déclencheurs sont pour la plupart identifiées (insulinorésistance, diabète de type 2, dyslipidémie et obésité).

L'évolution de la pathologie est lente et insidieuse, à ce jour elle ne peut être diagnostiquée chez l'homme que par la réalisation de biopsie hépatique. Au laboratoire, les modèles expérimentaux reproduisent chez l'animal la pathologie plus rapidement mais l'évaluation de l'efficacité des nouvelles molécules fait aussi appel à l'analyse histologique post-mortem.

Cette pathologie étant multifactorielle, les approches thérapeutiques sont nombreuses, cependant à ce jour, aucune molécule n'a reçu d'autorisation de mise sur le marché pour le traitement de la NASH.

Afin d'étudier nos hypothèses lors du développement de nos molécules, il nous sera inévitable d'avoir recours à des modèles animaux puisque les méthodes alternatives ne permettent pas de reproduire la pathologie telle que présente chez l'Homme. En effet, l'administration des composés dans le contexte d'un animal vivant permet d'évaluer la réelle efficacité des composés dans un système biologique complexe et « global ». Pour restreindre le nombre d'animaux utilisés, et ainsi répondre à la règle des 3R's, nous ne procédons aux évaluations *in vivo* que des molécules ayant franchi avec succès les phases de sélection effectuées sur des modèles acellulaires et cellulaires.

Pour développer de nouvelles thérapies nous devons avoir recours à des modèles expérimentaux divers. Dans notre projet, nous ferons appel à des animaux mutants qui présentent des troubles métaboliques spontanés (obésité, diabète). Nous les soumettrons à des régimes alimentaires standards ou spéciaux (enrichis en gras, en cholestérol et en sucre) qui amplifieront la pathologie et permettront de l'installer plus rapidement. Sous régime standard certaines souches mutantes n'arrivent pas à développer de NASH, alors que le régime enrichi en gras et sucre va permettre de mimer le régime « fast-food » associé à la progression de la pathologie chez l'homme. Cependant,

il a été démontré que certains animaux sont non répondant aux régimes « spéciaux » (le pourcentage dépend de la souche et du régime utilisé) et ne développent donc pas de NASH. C'est pourquoi il est important de pouvoir exclure ces animaux avant initiation des traitements avec une molécule d'intérêt afin de ne pas biaiser les résultats (faux positifs).

La réalisation d'une biopsie hépatique est une technique qui permet de sélectionner les animaux répondants au régime et ainsi de commencer le traitement sur des animaux ayant atteint un stade de la pathologie avancée. Ceci permettra de réduire l'hétérogénéité des résultats. De plus, le fait de connaître le meilleur moment pour commencer le traitement évite la répétition de la procédure et ainsi permet de réduire le nombre d'animaux utilisés ce qui répond à la règle des 3R's. Nous avons fait appel à une consultante extérieure qui nous aidera à la mise en place et à l'exécution de la meilleure chirurgie possible dans des conditions d'asepsie, d'anesthésie/analgesie et de soins postopératoires optimaux.

Les procédures utilisées sont adaptées afin d'optimiser le nombre d'animaux à engager dans les protocoles expérimentaux. En effet, en respect de la règle du raffinement, un ajustement strict du nombre d'animaux est effectué afin de maximiser les informations recueillies lors de la caractérisation et de la détermination des doses thérapeutiques optimales des molécules d'intérêt. De plus, il ne sera effectué sur les animaux que le nombre strict de prélèvements sanguins, en volume et en fréquence, compatibles avec la physiologie de l'animal. Les animaux seront sous observation quotidienne et aucun animal en détresse ou en souffrance ne sera maintenu dans cet état, il serait euthanasié par une méthode humaine adaptée le cas échéant.

Nous prévoyons l'emploi de 4 130 animaux (souris ou rat) au cours de la durée couverte par ce projet.

15070 Le glioblastome est une tumeur du cerveau très agressive, avec un pronostic sombre. La survie médiane est inférieure à 15 mois malgré une exérèse chirurgicale et un traitement par radiothérapie et chimiothérapie. L'immunothérapie et notamment les nouveaux traitements immuno-stimulants se sont avérés très prometteurs dans le traitement de divers cancers et pourraient donc prolonger de manière significative la survie des patients. L'efficacité de ces traitements se limite cependant à une sous population de patients.

Plusieurs approches vaccinales ont été développées, mais avec des résultats insuffisants chez l'Homme lors des essais cliniques. Récemment, une nouvelle formulation vaccinale a été découverte, utilisant la mélanine, qui permet d'obtenir une très forte réponse immunitaire et conséquemment une inhibition de la croissance tumorale, en se révélant beaucoup plus efficace que les meilleurs vaccins actuellement disponibles. Une confirmation dans un modèle animal (souris) de glioblastome est cependant incontournable pour trouver la formulation optimale de ce vaccin en termes de (1) efficacité et (2) innocuité.

1) L'efficacité de cette approche vaccinale sera évaluée dans un modèle animal (souris) de gliome cérébral, associé ou non à d'autres approches immunostimulantes pour définir la combinaison optimale. L'efficacité sera évaluée en fonction de la survie sans symptômes et de la réponse immunitaire locale par analyse des cerveaux lorsque les souris seront sacrifiées. Une surveillance quotidienne rigoureuse des animaux assurera l'absence de souffrance. Dès l'apparition de symptômes, selon les points limites, les souris seront sacrifiées sans délai.

2) Comme pour les autres immunothérapies, il existe un risque de réactions auto-immunes. De ce fait, dans la deuxième partie du projet, nous nous focaliserons sur l'innocuité de ce vaccin par l'étude d'un modèle animal (souris) de syndrome auto-immun. La survenue éventuelle d'une inflammation du cerveau sera explorée avec une rigoureuse surveillance clinique à la recherche de symptômes neurologiques et en étude histologique des prélèvements du cerveau lorsque les souris auront été sacrifiées.

L'étude chez l'animal est indispensable pour mesurer une réponse immunitaire par lymphocytes. Aucun modèle *in vitro* n'est en effet prédictif d'une réponse immune chez l'animal ou chez l'Homme, en raison de la complexité des mécanismes biologiques impliqués (interactions cellules dendritiques - lymphocytes). Le cerveau, en particulier, possède un microenvironnement immunitaire unique et

non reproductible *in vitro*. Un modèle de tumeur intracérébral est donc indispensable pour évaluer la réponse immunitaire et l'efficacité d'un vaccin contre le gliome. Cependant, les corrélations entre les résultats obtenus chez les souris et les résultats obtenus *in vitro* seront étudiées en permanence dans l'objectif de remplacer le modèle *in vivo* par la prédiction *in vitro* lorsque cela sera possible.

Le nombre d'animaux sera réduit à son minimum pour permettre une analyse statistique et fiable des résultats. Au total, un maximum de 456 souris sur 3 ans sera utilisé dans ce projet. Les protocoles seront optimisés en utilisant des modèles validés par la littérature, donnant des résultats reproductibles, et les expériences seront conduites dans les conditions le moins traumatisantes respectant au mieux les animaux. Les souris seront quatre par cage pour éviter l'isolement et un suivi rigoureux et régulier des animaux sera réalisé à fréquence quotidienne par une personne qualifiée.

Les injections sous-cutanées sont habituellement bien tolérées par les animaux mais une anesthésie sera néanmoins réalisée avant la procédure, L'implantation intracrânienne des cellules tumorales sera réalisée sous anesthésie générale et un traitement analgésique local et systémique préviendra la douleur post-opératoire.

Après chaque procédure, le réveil des animaux sera surveillé à la recherche d'éventuels signes d'inconfort. Un suivi rigoureux et régulier des souris sera réalisé et, en cas de souffrance, elles seront sacrifiées selon les points limites, sans délai d'attente.

15071 Les canaux ioniques sont de grosses molécules que l'on trouve à la surface des cellules. Ils sont essentiels à la fonction des cellules du système nerveux comme les neurones. Ils jouent notamment un rôle très important dans la transmission nerveuse, qui sous-tend les fonctions cérébrales comme l'apprentissage, la mémoire, la sensibilité à la douleur, ...

Globalement, on peut distinguer deux types de canaux ioniques les canaux responsable d'une activation des neurones, qu'on appelle des canaux excitateurs et les canaux responsable d'une répression de l'activité neuronale, qu'on appelle canaux inhibiteurs. En général, et de manière exclusive, un canal ionique appartient à une seule catégorie. Excitateur ou inhibiteur.

Nous nous intéressons dans notre laboratoire à l'un de ces canaux qui s'appelle TWIK1. Celui-ci présente la singularité de pouvoir passer d'une catégorie à l'autre en fonction de l'environnement cellulaire. Cette particularité est due à une composition moléculaire unique que nous savons contrôler pour rendre ce canal soit toujours excitateur soit toujours inhibiteur.

Ce canal est particulièrement bien représenté dans des structures du cerveau dont on sait qu'elles sont impliquées dans les phénomènes d'apprentissage et de mémoire ainsi que dans la perception douloureuse. Certaines de ces régions du cerveau, lorsqu'elles sont dysfonctionnelles sont connue pour contribuer à la survenue de la dépression.

Le but de notre projet est de comprendre le rôle de TWIK1 dans toute ces fonctions. Plus précisément, nous souhaitons comprendre quel est l'implication de la « versatilité » de ce canal (passage d'un état excitateur à inhibiteur et inversement) dans ces différentes fonctions.

Pour répondre à cet objectif, nous disposons de souris génétiquement modifiées qui n'expriment qu'une forme ou l'autre de TWIK1 ou qui ne l'exprime pas du tout. Toutes ces souris sont élevées depuis plus d'un an et aucun indicateur de mal-être traduisant un phénotype dommageable n'a pu être détecté. Nous soumettrons ces différentes souris mutantes à des tests comportementaux permettant d'explorer les fonctions d'intérêt (apprentissage, mémoire, douleur, dépression). Une étude récemment publiée a montré que les douleurs induites par un traitement chimiothérapique répandu (Taxol) était liées à un effet indirect de ce traitement sur TWIK1. Grâce à nos souris mutantes nous serons également en mesure de préciser la nature de cet effet. Les connaissances que ce projet nous permettra d'acquérir amélioreront notre compréhension fondamentale des fonctions de TWIK1 mais elles permettront également de dévoiler de possibles pistes thérapeutiques dans le traitement des anomalies des fonctions étudiées.

580 animaux seront nécessaires à l'ensemble du projet. Remplacement nous avons précédemment réalisé des expériences *in vitro* qui ont permis de renforcer les hypothèses formulées sur les propriétés de TWIK1 que nous devons maintenant confirmer *in vivo*. Nous

souhaitons valider cette hypothèse dans un organisme entier tel que la souris car actuellement, aucun système *in vitro* ne nous permet de reproduire l'ensemble des mécanismes physiologiques et cognitifs d'un organisme entier. De par ses similarités avec la physiologie humaine et parce ce que nous possédons plusieurs modèles génétiquement modifiés pour TWIK1, la souris constitue le meilleur modèle pour adresser nos questions dans une perspective préclinique. Réduction nous avons effectué une large recherche bibliographique afin de nous assurer de ne pas dupliquer des protocoles expérimentaux déjà réalisés. Cette recherche bibliographique nous a permis d'optimiser nos procédures et le nombre d'animaux à utiliser afin d'obtenir une réponse statistiquement pertinente. Raffinement afin d'éviter toute souffrance ou angoisse aux animaux, nous mettrons en œuvre tous les éléments de raffinement nécessaires. Nous nous servirons notamment de fiches permettant de suivre l'état de bien-être des animaux et de prendre les dispositions appropriées pour corriger un éventuel écart à se bien-être. Ces fiches contiennent des points limites précis, clairs et adaptés à nos expérimentations.

15072 La transplantation d'organe est la seule issue thérapeutique pour la plupart des pathologies conduisant à une perte irréversible de la fonction des organes vitaux. Le greffon, l'organe transplanté, est étranger à l'organisme du receveur et engendre une réaction immunitaire dite de « rejet », aigu ou chronique, qui reste la première cause de perte de fonction du greffon à long terme. L'incidence de rejet aigu à un an après transplantation varie entre 10% (rein) et 50% (poumon) Afin d'assurer la réussite d'une transplantation (à savoir prévenir et minimiser les rejets afin de garantir une survie à long terme des greffons), le patient est soumis à un traitement immunosuppresseur visant à déprimer son immunité. Ces traitements diffèrent en fonction de la période après la greffe. Parmi les traitements dit "d'induction" administrés immédiatement après la greffe, les plus largement utilisés demeurent les Sérum Anti-Lymphocytaires (SAL) ou Immunoglobulines (IgGs) Anti-Lymphocytes ou Anti-Thymocytes (ATG, Anti-Thymocyte Globulin).

Ces anticorps sont produits par l'immunisation d'animaux (IgGs de lapin actuellement commercialisées) contre des antigènes lymphocytaires humains. Cependant, ce traitement entraîne de nombreux effets secondaires liés à l'immunisation des receveurs contre les antigènes « animaux » (ou xéno-antigènes), parmi lesquels la maladie sérique (MS) qui associe fièvre, arthralgies, et lésions au niveau de la greffe. Nous avons ainsi produit un SAL innovant dans l'espèce porcine, par l'immunisation de porcs knock-out pour certains xéno-antigènes majeurs. Ces IgGs seraient capables de limiter la survenue des effets indésirables et parfois très graves. Cette innovation de production fait l'objet d'un brevet. Le produit thérapeutique LIS1 fait actuellement l'objet d'un essai clinique de phase I/II comme traitement d'induction chez des patients greffés rénaux. L'administration du SAL et d'immunoglobulines thérapeutiques de manière générale induit l'apparition d'anticorps anti-drogues (ADA) pouvant ainsi limiter son efficacité ou sa ré-administration future. Il est donc essentiel de monitorer l'apparition des ADA et de les quantifier chez les patients inclus dans l'essai clinique en cours. Pour permettre cette quantification il est nécessaire d'avoir un anticorps dirigé contre des IgG porcines et généré dans une espèce la plus proche possible de l'homme, le primate non humain. A ce jour aucun produit de ce type n'existe sur le marché.

L'objectif de ce projet est ainsi de générer chez le primate non humain des anticorps dirigés contre les IgG porcines indispensables pour évaluer l'apparition des ADAs et les quantifier chez les patients inclus dans l'essai clinique en cours, mais également dans les autres à venir. Tous nos anticorps glycohumanisés étant générés chez le porc. Deux primates seront inclus dans cette procédure expérimentale, réutilisés d'un protocole précédent après avis vétérinaire, de façon à réduire le nombre d'animaux utilisés. De façon à diminuer le stress, la souffrance et la douleur, le protocole d'immunisation sera réalisé chez ces animaux sous anesthésie légère et un traitement analgésique leur sera donné de façon adaptée en cas de réactions secondaires suite à l'immunisation. La fréquence d'observation des animaux est doublée lors des immunisations, passant de 3 à 6 fois par jours, et consiste en des examens cliniques de l'animal vigiles, permettant une prise en charge individuelle et adaptée.

Il n'existe pas de remplacement possible pour ces expérimentations qui répondent cependant aux exigences de réduction et de raffinement.

Les animaux seront hébergés avant protocole expérimental en volière, de façon à préserver leur mode de vie en communauté. Au cours du protocole expérimental les individus traités seront hébergés dans des cages séparées, mais jointives permettant la vision et la communication entre congénères. Un enrichissement alimentaire (fruits et/ou légumes) est donné quotidiennement, un enrichissement par jeux (différentes activités) est donné en rotation dans les cages selon un programme hebdomadaire. Enfin, un aménagement (perchoirs, cordes...) des cages permet un enrichissement de l'espace.

15073 La morphine est utilisée pour soulager les douleurs. Cependant, les mâles et les femelles présentent une différence de réponse à cet analgésique. En effet, les femelles nécessitent 30% de morphine en plus en comparaison des mâles. De plus, un traitement chronique à la morphine provoque une tolérance à l'analgésie qui apparaît plus vite chez les femelles. Il y a alors une diminution des effets de la morphine qui entraîne la nécessité d'augmenter les doses pour obtenir un effet analgésique équivalent. La tolérance est complexe et fait intervenir des phénomènes adaptatifs. L'inactivation des récepteurs à la morphine et leur implication dans la tolérance sont étudiées depuis de nombreuses années au niveau moléculaire, cependant, aucun traitement thérapeutique n'a été développé jusqu'à présent.

Ce projet utilise un modèle validé d'induction de la tolérance à la morphine chez la souris. Il évaluera les différences des cinétiques métaboliques de la morphine entre des souris mâles et femelles. Il testera également les effets analgésiques et le métabolisme de 3 molécules de morphine présentant des modifications. Des souris recevront soit des injections uniques de morphine ou des autres composés (traitement ponctuel), soit des injections répétées durant 10 jours. Nous étudierons les différences du métabolisme périphérique de la morphine par des analyses sanguines. Par ailleurs, l'effet analgésique sera déterminé à l'aide d'un test de nociception basé sur le réflexe de retrait de la queue. La mise en évidence d'une différence et/ou d'une adaptation physiologique suite à un traitement chronique à la morphine pourrait ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques pour le traitement de la tolérance à l'analgésie morphinique.

Adéquation avec la règle des 3R.

Remplacer Les modèles de culture cellulaire se heurtent à une transposition dans des modèles intégrés, la notion de tolérance étant uniquement visible et détectable chez l'animal par un test de comportement spécifique. C'est pour cette raison qu'une approche *in vivo* sur des souris est nécessaire.

Réduire Les différences attendues entre animaux sont de 15-20%. Le nombre d'animaux nécessaire à la réalisation des statistiques a été calculé afin d'avoir une puissance de 0,9. Un total de 576 souris C57BL6/J mâles (288) et femelles (288) sera utilisé lors de cette étude.

Raffiner Les animaux sont placés en cage par groupe de 5 individus. Ils seront maintenus dans un environnement enrichi selon les procédures en vigueur à l'animalerie (barre de bois à ronger, nid) qui permet un bien-être optimal des animaux (procédures en vigueur à l'animalerie). L'eau et la nourriture seront disponibles ad libitum. Les souris seront placées en cycle jour/nuit 12h/12h en condition de température et d'hygrométrie contrôlées. Il n'est attendu aucun stress ni aucune douleur prolongée chez les animaux. Nous avons établi des points-limite prédictifs permettant de soustraire l'animal à la souffrance.

15074 La pneumocystose se présente comme une infection fongique pulmonaire aéroportée et cosmopolite, touchant typiquement des sujets traversant des situations de profonde immunodépression. Elle est causée par un champignon microscopique appartenant au genre *Pneumocystis*. Sa prévalence relativement importante (deuxième infection fongique par ordre de fréquence derrière les candidoses), associée à ses forts taux de mortalité (environ 20 %) et aux effets indésirables non négligeables du traitement antifongique de première intention, font de la pneumocystose un sujet d'investigations scientifiques incontournable. Malheureusement, l'étude de

l'agent *Pneumocystis* est une tâche difficile à l'heure actuelle, aucun système de culture continue n'existe. Il s'agit-là d'une limite majeure pour comprendre la physiopathologie de la pneumocystose et notamment l'interaction entre *Pneumocystis* et les constituants du système immunitaire de l'hôte. Cependant, des progrès significatifs ont été réalisés grâce à des études menées chez l'animal. Grâce notamment à l'infection expérimentale générée chez la souris, nous savons que la pneumocystose n'affecte pas le sujet immunocompétent (celui-ci peut être « colonisé » de manière transitoire, mais sans jamais présenter de manifestation clinique), mais qu'elle survient principalement chez les sujets dont les défenses immunitaires sont fortement diminuées. Des recherches supplémentaires doivent cependant être menées pour comprendre plus en détails la régulation de l'infection à *Pneumocystis* chez l'hôte immunocompétent, aux niveaux cellulaire et protéique, ainsi que son développement clinique chez l'immunodéprimé.

A ce jour, il apparaît donc indiscutable que les modèles animaux demeurent l'unique solution afin (i) d'obtenir en quantité importante des microorganismes *Pneumocystis* viables et infectieux pour reproduire des expériences de laboratoire (ii) de comprendre la physiopathologie de la maladie et le mode de prolifération du champignon dans les alvéoles pulmonaires, ainsi que pour détailler la réponse immunologique et inflammatoire au cours de l'infection; (iii) d'évaluer l'activité anti-*Pneumocystis* de nouvelles drogues alternatives.

Au final à travers ce travail, nous ambitionnons donc de définir des déterminants immunologiques de l'hôte pouvant servir de cibles immuno-modulatrices au cours du traitement curatif de la pneumocystose. Celle-ci étant une infection uniquement pulmonaire, nous envisageons à terme une administration des nouvelles thérapies immuno-modulatrices par aérosolthérapie.

Ce projet expérimental répondra aux exigences des 3R, à savoir

- Remplacement jusqu'à présent, aucun système *in vitro* ne permet de reproduire les caractéristiques d'infections respiratoires et le modèle murin constitue un modèle expérimental pertinent.
- Réduction le nombre d'animaux est optimisé, limité à 700 pour toute la durée du projet, en réalisant un maximum d'analyses sur chaque animal (cellules immunitaires, cytokines, expression des gènes, histologie, évaluation de la charge du pathogène, ...).
- Raffinement les animaux seront élevés en communauté dans des cages enrichies avec du sopalin et fragments de boîtes d'œufs. Tout au long du déroulement des expériences, une observation systématique pluriquotidienne de leur état clinique sera réalisée par les animaliers et les expérimentateurs, afin de détecter au plus tôt une éventuelle souffrance animale.

15075 La spermatogenèse est un processus très spécialisé. La reprogrammation du génome male après la dernière division cellulaire est un processus fondamental encore très mal connu. Elle est associée à une réorganisation complète du génome, puisque la majorité des histones est remplacée par d'autres protéines s'associant spécifiquement au génome male et le compactant dans le spermatozoïde.

Nous étudions un gène codant pour une protéine participant à la compaction de l'ADN dans les spermatozoïdes et potentiellement liée à l'oxydation des lipides.

Des découvertes récentes ont lié les protéines, l'ADN, et l'oxydation lipidique au niveau biochimique, En revanche peu de choses sont connues sur la relation entre le métabolisme cellulaire, le stress oxydatif adipeux et la fertilité. Nos travaux comportent des applications non seulement dans le domaine de la procréation médicale assistée, mais aussi, en cancérologie. En effet, notre protéine d'intérêt n'est normalement exprimé que dans les cellules germinales mâles mais, lors de la transformation cellulaire, ce facteur est sur-exprimé « hors contexte ». Il est par conséquent un très bon candidat de marqueur de cancer ou de cible potentielle pour de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Remplacer : Bien que les propriétés fonctionnelles des nouveaux facteurs que nous identifions puissent être initialement abordées par des tests *in vitro* et dans des modèles de cultures cellulaires, il n'est pas possible d'appréhender l'ensemble des mécanismes que nous étudions dans des

modèles *in vitro* ou *ex vivo*. A ce jour et à notre connaissance il n'existe pas de modèle de culture de spermatozoïdes. Il est donc très difficile d'étudier la compaction du génome mâle chez la souris en l'absence du modèle de la souris. Nous avons développé des modèles alternatifs en transfectant dans différentes lignées cellulaires divers constructions plasmidiques de facteurs testiculaires mais ce système présente plusieurs limites. Ce modèle de culture *in vitro* est en effet très loin de la physiologie animale et ne reflète pas les événements de remodelage de la chromatine qui ont lieu *in vivo*.

Réduire : Dans ce projet nous allons utiliser 40 souris modifiées génétiquement pour notre gène d'intérêt. Ce nombre maximal fera l'objet de tests statistiques à préciser

Raffiner : Nos expériences ne devraient pas entraîner de douleur ou de stress aux animaux, seulement une infertilité, et un début de prise de poids selon les régimes alimentaires. Les points-limites fixés correspondent à une contrainte légère. De fait, la prise de poids sera contrôlée 2 fois par semaine afin d'être limitée en deçà de 50 %. Aussi, si des symptômes diabétiques apparaissaient, les cages d'hébergement pourraient être changées tous les jours. Toutefois si 1 au moins de ces 2 points-limites était atteint, l'animal concerné arrêterait prématurément la procédure expérimentale.

15076 Ce projet consiste à réaliser la formation pratique des personnels Concepteur ou Appicateur de projets expérimentaux utilisant des animaux à des fins scientifiques (chercheurs, enseignants-chercheurs et doctorants). En effet, selon le décret 2013-118 du 1er février 2013, toute personne manipulant des animaux vivants dans le cadre d'une activité de recherche ou pédagogique doit avoir suivi et validé une formation initiale spécifique Appicateur ou Concepteur, agréée par le ministère de l'agriculture et de l'alimentation et adossée réglementairement à l'agrément des locaux d'animalerie de l'établissement porteur du projet de formation. Cette formation qui répond au cadre réglementaire sera réalisée dans le module complémentaire de la formation initiale avec une spécialisation « rongeurs » (rats/souris). Des sessions de travaux pratiques seront réalisées afin de former les personnels aux techniques de base de manipulation des rongeurs.

Conformité/exigences de la règle des 3R :

Remplacer : La formation aux bons gestes techniques permettant ensuite de raffiner et de réduire le nombre d'animaux utilisés dans les projets scientifiques ne peut pas être réalisée autrement que sur l'animal.

Réduire Le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum tout en permettant la réalisation des actes expérimentaux pour chaque personne en formation en réduisant le nombre de manipulation sur chaque animal.

Raffiner Pendant toute la période précédant la mise en oeuvre du projet, les animaux auront reçu un enrichissement adapté. Les animaux utilisés seront issus d'élevages et destinés à l'euthanasie (animaux surnuméraires sexe et génotype en inadéquation avec les projets en cours, animaux reproducteurs trop âgés).

Toutes les procédures utilisées dans ce projet rentrent dans la classification des procédures de classe légère. Afin que chaque personnel en formation appréhende les gestes techniques qui seront réalisés dans la partie pratique de leur formation, des enseignements en travaux dirigés utilisant des vidéos de démonstration et des mannequins en silicone « réalistes » précéderont les travaux pratiques.

Les animaux utilisés dans ce projet sont des animaux surnuméraires issus des élevages. 400 animaux seront utilisés au maximum dans ce projet sur une durée de 5 ans (200 souris et 200 rats).

15077 Nos projets visent à étudier l'efficacité de nouveaux traitements anticancéreux dans des cancers des voies aérodigestives supérieures (VADS) qui présentent soit une insensibilité soit ayant acquis des résistances aux thérapies conventionnelles et indiqués dans ces cancers.

Le cancer des voies aéro-digestives supérieures est le 5ème cancer le plus fréquent en France et représente la 7ème cause de mortalité par cancer. En France, en 2010, on a estimé 14 000 nouveaux cas de cancers ORL et 5000 décès par an. Le traitement repose sur une chirurgie

d'exérèse, lorsqu'elle est possible, associée à la chimiothérapie (cisplatine) et à la radiothérapie (photonthérapie) selon les stades et l'extension.

La procédure a pour but de déterminer l'efficacité de l'association des traitements de référence à un inhibiteur de la « Polo Like Kinase (PLK1) ». Cette expérience a pour objectif de proposer cette alternative de traitement aux patients atteints de cancers VADS.

D'un point de vue éthique et conformément aux exigences de remplacement, réduction et raffinement, les expériences sur les animaux ont été précédées de nombreuses expériences réalisées sur des lignées cellulaires. Ces mises au point *in vitro* nous permettent de diminuer le nombre d'animaux à utiliser dans les expériences *in vivo*. De plus, une grande importance sera accordée au bien-être des animaux avec un suivi régulier, par un personnel formé à l'expérimentation animale, afin de détecter tout signe de détresse et/ou de souffrance suite à l'injection des cellules en sous cutanée mais aussi suite à l'administration des différents traitements. Nous utiliserons des antalgiques et des anesthésiques afin d'accentuer la gestion de la douleur.

Aucun effet néfaste des composés n'est attendu (précédentes expérimentations)

Nous utiliserons pour ce projet un total de 100 souris. Ces souris sont immunocompétentes ce qui permet de réaliser une étude "préclinique" dans un système intégré et possédant un système immunitaire actif.

En vue de futures applications cliniques qui exigent la démonstration d'efficacité de traitement sur au moins un modèle animal, ces études *in vivo* sont nécessaires et incontournables

15078 L'excès de tissu adipeux est suspecté être à l'origine des complications associées à l'obésité dont la résistance à l'action de l'insuline qui peut ensuite évoluer en diabète. Une protéine a été identifiée dans le tissu adipeux dont l'expression est inversement proportionnelle à la taille des adipocytes. Elle a jusqu'à présent été essentiellement étudiée dans le foie. Par des approches de mesure d'expression génique, chez l'Homme et dans plusieurs cohortes, l'expression du gène codant pour cette protéine dans le tissu adipeux a été montrée fortement associée à la sensibilité à l'insuline. Les effets d'une surexpression de cette protéine spécifiquement dans le tissu adipeux seront étudiés *in vivo* afin de tester si une forte expression dans ce tissu, comme c'est le cas dans le tissu adipeux d'individus minces et non diabétiques, peut protéger du développement d'une résistance à l'action de l'insuline. Pour répondre à la question essentielle de la contribution de cette protéine issue du tissu adipeux à la sensibilité à l'insuline locale et systémique, comparativement à celle provenant du foie, les études *in vitro* ne suffisent pas. Bien que des expériences préliminaires ont été réalisées au préalable sur des explants de tissu adipeux, seuls les modèles animaux peuvent répondre à ces questions de physiologie intégrée. Les investigations seront menées en accord avec la règle des 3R : des groupes de 10 souris mâles par condition expérimentale sont suffisants pour estimer l'importance de cette protéine dans le tissu adipeux dans la protection contre la dégradation de la sensibilité à l'insuline. Pour ajuster les conditions expérimentales, les investigations seront menées 3 fois au maximum. Au total 150 souris réparties en 5 groupes seront utilisés. Les souris seront hébergées dans une structure répondant aux exigences légales et ayant obtenu l'agrément. Un enrichissement sera apporté dans chacune des cages (feuilles essuie-tout). Si nécessaire, des tubes ou igloos pourront être ajoutés. La nourriture et la boisson seront mises à disposition à volonté. Un technicien de la structure passera tous les jours (week-end et jours fériés inclus) pour vérifier les souris, les mangeoires et les biberons. Les points limites décidés pour ce programme sont une perte de poids excessive, une prostration, l'absence de toilette, la déshydratation.

15079 Ces dernières années, le rôle de l'environnement dans les réactions immunitaires a été mis en évidence dans plusieurs études. En particulier, nous étudions une molécule exprimée par les cellules du système immunitaire, et qui réagit à des composés produits par les bactéries de la flore intestinale ou présents dans certains aliments d'origine végétale.

Le but de ce projet est de mieux comprendre le rôle de cette molécule dans les réactions allergiques, telles que les allergies cutanées ou respiratoires. Cette question n'a encore jamais été étudiée, et

nos premiers résultats obtenus *in vitro* laissent penser que cette molécule pourrait avoir un rôle clé, ignoré jusqu'ici.

Cette étude durera au maximum 5 ans. Seuls des tests *in vivo*, dans un organisme entier, permettront d'étudier les relations complexes entre système immunitaire, alimentation et flore intestinale dans l'allergie. Nous utiliserons des souris C57BL/6 qui sont un modèle classique pour étudier le système immunitaire. Nous injecterons une substance, sous la peau ou dans les voies respiratoires, afin de créer une réaction allergique. Dans certaines expériences, les souris seront traitées par des antibiotiques pour éliminer les bactéries de la flore intestinale. Dans d'autres expériences, les souris seront nourries avec un complément alimentaire afin d'étudier l'effet de certains composés alimentaires.

Ce projet répond aux exigences de remplacement, réduction et raffinement. Nos premières expériences ont été réalisées *in vitro*. Un maximum de 2064 animaux sera utilisé pour ce projet sur 5 ans. Pour chaque expérience, nous utiliserons le minimum d'animaux permettant d'obtenir des résultats statistiquement fiables et scientifiquement valides (incluant les groupes contrôles nécessaires). De plus, chaque animal sera utilisé pour analyser plusieurs paramètres des cellules du système immunitaire et de l'allergie, ce qui permettra d'optimiser les données obtenues sur chaque animal. En accord avec les recommandations internationales, les animaux seront suivis quotidiennement afin d'assurer leur bien-être et les expérimentations sont arrêtées avant la souffrance des animaux.

15080 Les animaux utilisés dans ce projet correspondent à des modèles d'étude du cancer du pancréas pour lequel aucun traitement efficace n'est à l'heure actuelle disponible et qui est le 4^{ème} cancer le plus mortel. Quatre-vingt-quinze pour cent des patients diagnostiqués sont décédés à 5 ans, qu'ils aient été opérés ou non et l'incidence de ce cancer est en hausse (en 2010 = 7800 nouveaux cas / an). Il s'agit donc d'une pathologie de santé publique. Comprendre la résistance aux traitements est un axe de recherche qui devrait permettre d'améliorer ce terrible pronostic. Des études récentes démontrent que l'inaccessibilité des drogues à la tumeur serait au moins en partie responsable de l'absence d'effet thérapeutique des chimiothérapies dans ce cancer, et ce du fait d'une très faible vascularisation de ces tumeurs. Cette faible vascularisation serait la conséquence d'une fibrose (la transformation du tissu en un tissu composé de fibres). Pour mimer la pathologie humaine, nous avons besoin de modèles murins la reproduisant, et il s'agit des modèles transgéniques qui sont les modèles les plus proches de la pathologie humaine (souris avec système immunitaire fonctionnel) ou des modèles de greffe d'échantillons de tumeurs humaines dans des souris dont le système immunitaire n'est pas fonctionnel (Patient-Derived Xenograft, PDX). Les tumeurs greffées comprennent la tumeur humaine dans son hétérogénéité cellulaire et moléculaire (1 PDX pour 1 tumeur humaine pour laquelle nous pouvons avoir les données cliniques associées au patient). Pour l'étude plus spécifique de l'implication de gènes dans les échanges cellules cancéreuses pancréatiques et cellules du microenvironnement, des modèles murins où ces cellules sont implantées dans le pancréas, sont indispensables pour reproduire, dans l'organe, la tumeur dans toute son hétérogénéité et les échanges tumeur / organisme hôte, qui vont déterminer la progression tumorale, métastatique et la réponse aux traitements. Ces expériences ne peuvent être réalisées que directement chez l'animal car les interactions cancer / microenvironnement (réaction fibreuse) / réaction de l'hôte ne peuvent pas encore être mimées *in vitro*. Le respect de la règle des 3R sera appliqué dès que possible en remplaçant les études sur les modèles murins par des expérimentations réalisées sur des cultures de cellules isolées de nos modèles murins, qui peuvent être maintenues plusieurs semaines en culture et permettront de valider nos résultats tout en réduisant le nombre de souris à inclure dans les protocoles; d'autre part, étant donné que les souris transgéniques sont incluses dans les protocoles au fur et à mesure de leur génotypage, une analyse statistique continue de nos résultats permettra de stopper l'inclusion de nouveaux animaux dans les protocoles ainsi raffinés dès que ces analyses atteindront la relevance statistique. Une évaluation quotidienne de l'état clinique des souris sera réalisée afin de s'assurer de leur bien-être. En fonction des expérimentations et pour éviter la souffrance des animaux (douleur supérieure à celle d'une piqûre d'aiguille), les souris seront anesthésiées, traitées avec des analgésiques.

Lorsque les points limites seront atteints (perte de poids supérieure à 20%, volume tumoral >1cm³ ou état de choc, prostration, léthargie, inconscience ou immobilité de l'animal) les animaux seront euthanasiés. Lorsqu'il sera nécessaire (animal isolé, animaux agités...), un enrichissement (bâton de bois, igloos ou tunnel) sera ajouté dans la cage. Il s'agit d'un projet d'équipe d'une longueur estimée à 5 ans, avec utilisation de 662 souris transgéniques, 600 souris immunodéprimées et 1368 souris de fond génétique C57/Bl6, soit 2630 animaux.

15081 Le microbiote intestinal humain est composé de 1014 bactéries ainsi que de nombreux autres micro-organismes tel que des virus, des champignons et des archées. L'étude du microbiote a démontré un rôle fondamental de celui-ci dans la physiologie intestinale mais également dans la santé humaine en révélant une symbiose générale entre les différents acteurs. Le microbiote intestinal est impliqué dans la maturation du système immunitaire et dans de nombreuses voies métaboliques fondamentales comme la fermentation des sucres et des protéines ainsi que le métabolisme des acides biliaires et des xénobiotiques. Ainsi, un déséquilibre des populations du microbiote intestinal, aussi appelé dysbiose, peut conduire à des conséquences fonctionnelles importantes et est impliqué dans de nombreuses pathologies digestives (e.g. cancer colorectal, maladies inflammatoires chroniques intestinales) mais également dans l'obésité et l'autisme.

Dans ce contexte, nous avons pour but d'étudier la possibilité de faire exprimer des molécules immunitaires au sein du microbiote intestinal au cours d'une infection afin de rétablir une situation de symbiose. Nous utiliserons pour cela des animaux à flore conventionnelle ainsi que des souris présentant une délétion dans la séquence codante pour un gène du système immunitaire pour tester l'efficacité de notre technologie. Bien que des tests *in vitro* puissent être menés concernant l'expression de facteurs de l'immunité via une cellule bactérienne, une étude chez l'animal est inévitable pour récapituler l'effet complexe du tractus gastro intestinal. Le recours à l'animal est nécessaire pour notre étude car aucun modèle *in vitro* ne peut actuellement totalement reproduire la complexité du tractus gastro-intestinal. En effet, bien qu'il existe des systèmes permettant de simuler l'environnement intestinal de mammifères au laboratoire, l'architecture de l'organe ainsi que la diversité cellulaire ne peut être reproduit. De plus, dans notre cas la réponse à l'expression des marqueurs de l'immunité doit être étudiée dans l'environnement intestinal afin de conclure sur le côté bénéfique de celle-ci. Les animaux immuno-déficients représentent donc le modèle idéal pour l'étude que nous souhaitons entreprendre.

Dans ce projet, 2444 souris de 4 à 6 semaines seront utilisées sur 5 ans d'expérimentation. Une démonstration de l'efficacité de notre technologie dans ce contexte particulier est une étape essentielle pour la compréhension globale de ces dérèglements intestinaux mais également pour la poursuite de notre développement vers une étude clinique. Le nombre d'animaux que nous estimons nécessaire repose sur une étude statistique pour obtenir des résultats significatifs ainsi que sur notre propre expérience de la conception d'études de ce type. Une étude biostatistique est également effectuée avant chaque expérimentation pour être sûr d'utiliser le nombre d'animaux nécessaire pour atteindre l'objectif fixé.

Plus précisément, ce projet contient 6 procédures distinctes avec un degré de sévérité propre à chacune avec la répartition suivante. Bien que les souches d'E. coli ne soient pas des pathogènes intestinaux chez la souris, l'introduction d'une souche bactérienne dans les souris déficientes pour un facteur de l'immunité pourrait tout de même entraîner une colite en raison de leur terrain immunitaire favorable. C'est pourquoi, afin de réduire au minimum le risque de souffrance animale, nos expériences porteront sur des temps courts de 7 jours avec des souches bactériennes commensales n'exprimant aucune toxine. Un suivi quotidien des animaux sera effectué et des points limites ont été établis afin de minimiser l'impact sur les animaux. En ce sens, les animaux présentant certains symptômes cliniques (perte de poids dont le seuil est adapté à chaque procédure et ne rétrocedant pas sous traitement, aspect moribond, diarrhée avec présence de sang) seront immédiatement mis à mort. Les souris à flore conventionnelle quant à elles, ne devraient déclencher aucun symptôme suite à l'administration des souches bactériennes. Le niveau de sévérité attendu dans ce projet est léger pour une des 6 procédures et modéré pour les 5 autres. Les animaux seront mis à mort à la fin de l'étude.

15082 L'évaluation des interactions possibles et des effets secondaires potentiels des dispositifs médicaux mis en contact avec le corps humain (Biocompatibilité) est exigée par les autorités réglementaires. Le but de ce projet est de tester la biocompatibilité d'implants dentaires destinés à l'homme après implantation chez le chien qui est une des espèces recommandées et la plus utilisée pour ce genre de test. A ce jour, aucun modèle *in vitro* ni méthode alternative ne permet d'étudier la biocompatibilité après implantation. Il est donc indispensable de recourir à l'animal entier pour étudier ce phénomène

Avant de pouvoir implanter ces biomatériaux, il est nécessaire de pratiquer une extraction dentaire sous anesthésie générale afin de préparer les sites d'implantation. Au moins deux mois après extraction et après avoir vérifié la cicatrisation complète des sites, des implants dentaires avec vis de cicatrisation seront placés sous anesthésie générale. Les vis de cicatrisation pourront être éventuellement remplacées sous anesthésie générale environ quatre semaines après implantation pour analyse. Un suivi des animaux (suivi clinique, soins buccodentaires, radiographies) sera ensuite réalisé tout au long de ce projet de la mise en place des implants jusqu'à leurs retraits. Les animaux seront euthanasiés à différents intervalles de temps et le site d'implantation sera prélevé dans le but d'effectuer un examen histologique pour évaluer la biocompatibilité (réactions des tissus aux niveaux des implants).

Au maximum pour ce projet, nous prévoyons de réaliser 4 études par an soit 20 études en 5 ans.

Le nombre d'animaux sera toujours réduit au minimum et sera compris entre 4 à 8 animaux en tenant compte de la variabilité des résultats attendus.

Au total, au maximum 120 chiens pourront être utilisés en 5 ans dans ce projet.

Une évaluation éthique préalable sera faite pour chaque étude.

Durant toute la phase expérimentale, les animaux seront hébergés en groupe. Toute intervention sur l'animal sera effectuée par une personne habilitée et expérimentée afin de réduire au minimum le stress.

L'extraction dentaire et l'implantation des dispositifs seront réalisées par des chirurgiens expérimentés sous anesthésie générale, un traitement antalgique post opératoire adapté sera administré aux animaux.

15083 Les recherches archéozoologiques ont documentées la présence de naissances d'automne dans les élevages ovins au Néolithique (-7000 AV JC). Ceci peut être la conséquence de deux situations (1) il existe des ovulations spontanées au printemps et des fécondations ont lieu alors que les béliers sont présents toute l'année dans le troupeau, ou bien (2) l'éleveur sépare les deux sexes puis ré-introduit volontairement les béliers ("effet mâle" ou effet bélier) pour une lutte de printemps. La deuxième situation signifierait un état assez avancé des connaissances et la mise en œuvre d'innovations associées à l'élevage ovin à cette période par les éleveurs du Néolithique.

L'objet du présent protocole est de tester si des brebis Lacaune (a) en présence de béliers, ovulent spontanément au printemps et si oui dans quelles proportions et (b) quelle est l'efficacité d'un effet bélier au printemps en termes d'ovulations.

A cette fin, cette expérience utilisera 45 brebis Lacaune et 5 béliers vasectomisés.

Sur le plan des 3 R, les précautions suivantes seront prises

- remplacement aucune méthode ne permet à l'heure actuelle d'étudier une réponse physiologique intégrée comme l'effet mâle par des méthodes substitutives *in vitro* ou de modélisation.

- réduction le nombre d'animaux a été réduit au maximum compte tenu des techniques utilisées.

- raffinement les animaux seront hébergés dans leur lieu d'élevage en groupes sociaux sur paille. Pour réduire la douleur lors de la prise de sang et limiter l'angoisse des animaux, les brebis sont entraînées à coopérer. Ainsi un travail préalable d'habituation au couloir de circulation et à la contention est réalisé. La contention est faite par une personne habilitée, que les brebis connaissent. Si un des points limites est observé sur une brebis baisse de l'ingestion, réticente au

déplacement, incapacité à se déplacer, interactions sociales altérées (brebis à l'écart) la prise de sang ne se fera pas.

15084 Le modèle murin d'ischémie cérébrale est largement utilisé en recherche préclinique afin de tester des traitements pouvant diminuer la taille de la zone atteinte du cerveau et par conséquent de limiter les dommages cognitifs et moteurs. L'objectif de la présente étude est de calculer la taille de la zone à risque (= zone hypo-perfusée) du cerveau suite à une occlusion artérielle à l'aide d'un nouvel appareil d'imagerie puissant et non invasif. Deux types d'ischémie seront étudiées permanente ou transitoire afin d'identifier une possible corrélation entre la taille de la zone à risque visible en imagerie et la taille de la zone nécrosée accessible en post-mortem. Cette étude est prévue pour une durée approximative d'un an et à terme permettra de valider ou non l'intérêt de ce nouvel appareil d'imagerie dans la thématique de recherche sur la protection des tissus suite à un accident vasculaire cérébral de type ischémique. Par la suite, de prochaines études pourront porter sur l'effet de nouveaux traitements sur la taille de la zone nécrosée rapportée à la taille de la zone à risque. Les animaux seront anesthésiés et opérés par des personnes compétentes et qualifiées pour occlure de façon transitoire ou permanente une artère irriguant le cerveau. Les souris seront ensuite échographiées par des personnes formées à l'appareil et aidées par une experte échographe afin de visualiser les flux sanguins et de mesurer la taille de la zone à risque grâce à différents types d'imagerie (B-mode, doppler color, imagerie de contraste). La zone à risque pourra être étudiée après injection en veine caudale (non invasif) d'un produit de contraste adapté à l'animal. Cette étude doit obligatoirement être réalisée sur animaux vivants étant donné que c'est la perfusion de l'organe qui est étudiée. L'espèce utilisée sera la souris du fait que l'appareil et les sondes échographiques associées sont prévues pour cet animal et que le modèle d'ischémie est maîtrisé sur cette espèce. Au total 53 animaux seront étudiés. Parmi ce nombre, 6 souris seront étroitement observées lors d'une pré-étude pour raffiner au mieux les paramètres d'une fiche de suivi post-opératoire et les points limites. Pour chacun des deux groupes expérimentaux, le nombre minimal et suffisant d'animaux pour pouvoir répondre à notre question a été estimé grâce à une pré-étude sur l'appareil d'échographie et en tenant compte de la mortalité liée à l'intervention chirurgicale. Les souris recevront des doses d'anesthésiques et d'analgésiques adaptées tout au long de l'étude afin de limiter au maximum la douleur. L'ischémie cérébrale peut entraîner des déficits neurologiques pouvant impliquer une diminution des capacités locomotrices de l'animal. C'est pourquoi les animaux feront l'objet d'un suivi renforcé après l'opération en s'appuyant sur une fiche d'observation permettant de mettre en évidence un éventuel point limite et d'agir en conséquence avec l'avis du vétérinaire référent. Un certain nombre de mesures seront prises afin de limiter au maximum la souffrance et la douleur de l'animal tout au long de la procédure. Un anesthésique local sous forme de crème sera appliqué sur la queue de l'animal pour limiter la douleur liée à la pose du cathéter. De plus, au réveil l'animal sera hydraté et placé dans une couveuse chauffée avec un air enrichi en oxygène et aliment gélifié pour faciliter la prise alimentaire.

15085 Chez l'homme, la toxine botulique (BoNT), de sous-type A (BoNT/A) est l'un des seuls traitements disponibles pour traiter les symptômes des maladies neuromusculaires (injection intramusculaire). Cependant l'existence d'autres sous-types de BoNTs et la mise en évidence de différents mécanismes d'action conduisent à de nombreuses recherches pour élargir l'utilisation des BoNTs à d'autres types de pathologies telles que la douleur. Une technique très efficace pour visualiser, localiser et quantifier l'activité d'une BoNT est le marquage immunohistochimique (IHC). Cette technique nécessite des anticorps qui vont reconnaître (spécificité) et mettre en évidence l'activité de la BoNT dans le tissu où elle a été injectée mais aussi si elle atteint d'autres tissus. La spécificité des anticorps utilisés doit être contrôlée afin de s'assurer que des marquages obtenus sont bien liés à la BoNT injectée et que les observations/conclusions faites ensuite dans des situations pathologiques soient solides. Pour tester et mettre au point ces anticorps, il est nécessaire de disposer de tissus sains contenant de fortes quantités de la protéine cible de la BoNT étudiée. Le tissu de choix est le cerveau, car la littérature a montré que cet organe exprime fortement toutes les cibles connues des différents sérotypes, qui sont majoritairement neuronales. La seule source disponible de cerveau sain, injecté avec de la BoNT puis prélevé dans les meilleures conditions,

est celle de l'animal et en particulier le rongeur (rat et souris), espèces les plus couramment utilisées pour étudier les BoNTs. De plus, il est aussi indispensable de valider les anticorps sur des tissus représentatifs des conditions (organes fixés en formol et inclus en paraffine) et modèles dans lesquels ils seront utilisés dans les futures études de recherche (pas de Remplacement possible).

L'objectif de ce projet est donc de fournir des cerveaux de rats adultes sains injectés par de la BoNT sur lesquels sera testée la qualité des anticorps nécessaires aux études de recherche. Les prélèvements se feront entre 1 et 6 jours après l'administration en fonction de la cinétique d'action de la toxine étudiée.

Le marquage IHC est réalisé sur des coupes de tissu d'environ 5µm, le cerveau d'un seul animal peut donc fournir un grand nombre de coupes. Tissus et coupes peuvent être conservés sur une période de plusieurs mois.

Ainsi, seulement 8 d'animaux seront nécessaires par type de toxine (Réduction).

Une fois validés les anticorps pourront être utilisés dans différents modèles animaux et dosages *in vitro*.

Tout au long de l'étude, les animaux sont hébergés en groupe dans un environnement avec des objets d'enrichissement (bâton à ronger et tube en carton pour se cacher).

L'injection de BoNT est réalisée sous anesthésie chimique générale. Un traitement analgésique pré-et post opératoire est donné pour limiter la douleur et l'angoisse des animaux. Après une incision de la peau du crane (1-2 cm), un trou d'environ 2 mm de diamètre est fait au travers de l'os du crâne sans toucher les tissus en dessous.

L'injection de BoNT est faite de façon précise et maîtrisée grâce à un micromanipulateur, l'animal étant positionné sur une table de contention conçue pour les administrations intra-cérébrales. La peau est désinfectée avant et après l'incision qui est refermée par une agrafe. Il n'est pas attendu d'effets délétères des doses de toxine testées, basées sur la littérature et des données internes. Les doses efficaces et toxiques de BoNT/A sont bien connues et maîtrisées, ainsi que les signes cliniques précurseurs d'une intoxication aux BoNTs, ce qui permet d'établir une liste de points limites stricts (Raffinement).

Le nombre d'animaux utilisé pour ce projet est estimé à 85, avec un nombre de rats traités réduit à 3/groupe, strict minimum pour pouvoir atteindre les objectifs (Réduction).

15086 Le paludisme reste une cause majeure de mortalité et de morbidité dans le monde. Cette maladie tue jusqu'à un million de personnes par an, principalement des enfants de moins de cinq ans en Afrique subsaharienne. Le Paludisme est du à un parasite eucaryote unicellulaire, appelé Plasmodium, dont il existe de nombreuses espèces.

La maladie comporte deux phases. La première, asymptomatique, suit la piqûre infectante par le moustique hématophage hôte et vecteur de Plasmodium, et précède l'infection des globules rouges. Cette première phase consiste essentiellement en un cycle de multiplication dans le foie des quelques parasites injectés par le moustique. Cette phase de multiplication dans le foie génère la forme du parasite qui infecte les globules rouges/érythrocytes. La seconde phase est responsable de tous les symptômes et complications de la maladie, et consiste en des cycles répétés de multiplication du parasite à l'intérieur des globules rouges.

La phase érythrocytaire symptomatique de la maladie est la plus étudiée. Sa particularité est de pouvoir, pour certaines espèces de Plasmodium, être reproduite *in vitro* dans des systèmes de culture d'érythrocytes humains et donc de pouvoir analyser les espèces qui infectent l'homme, en particulier Plasmodium falciparum, l'espèce la plus mortelle.

En revanche, l'étude de la phase pré-érythrocytaire, qui se déroule dans la peau et le foie, nécessite l'utilisation de modèles animaux. Depuis les années 1950, parmi les différentes espèces de Plasmodium qui infectent les rongeurs - et qui reproduisent le comportement des espèces qui infectent l'homme -, les espèces *P. berghei* et *P. yoelii*, sont devenues les espèces de choix pour étudier la phase pré-érythrocytaire du paludisme car elles sont adaptées aux moustiques et rongeurs de laboratoire maintenus respectivement dans un insectarium et une animalerie.

Les mécanismes moléculaires impliqués dans la réplication du parasite dans les hépatocytes restent à découvrir. Nous savons qu'une enzyme de l'hôte, l'AMP Kinase, a déjà été identifiée comme régulateur principal du métabolisme et que son activité influe sur l'infection du foie par Plasmodium. L'activité de cette enzyme peut être renforcée par des restrictions alimentaires ou des médicaments, réduisant ainsi l'infection. Nous proposons ici d'étudier le mécanisme sous-jacent à cette réduction et plus avant, l'impact du métabolisme de l'hôte sur l'infection au stade hépatique.

Nous allons utiliser des souris transgéniques à fin d'étudier les interactions entre le parasite et l'hôte (son arrivée dans le foie, son entrée et son développement dans la cellule hépatique) pourront être analysées par microscopie en temps réel cellule par cellule.

Dans cette étude pilote ne comprenant qu'une seule procédure sans réveil, nous allons utiliser 6 souris C57BL/6 (de même fonds génétique que les souris transgéniques que nous utiliserons dans le projet principal que nous déposerons si cette étude préliminaire est concluante) pour tester différents protocoles d'anesthésie et différentes doses de parasites. Ce nombre d'animaux est le nombre minimum suffisant pour définir la taille des groupes qu'il sera nécessaire d'étudier dans le projet principal pour acquérir un nombre d'évènements d'infection statistiquement satisfaisant.

15087 Au cours du vieillissement, une inflammation chronique, stérile, de bas grade - appelée inflammaging - se développe, ce qui contribue à la pathogenèse des maladies liées au vieillissement. Cette inflammation chronique perturbe la structure des tissus, nuit à leur bon fonctionnement et peut, entraîner une défaillance des organes. Parmi les sources possibles d'inflammation chronique observées au cours du vieillissement et des maladies liées à l'âge, la dérégulation des monocytes/macrophages est reportée et plus précisément il a été mis en évidence une altération de leurs capacités de résolution de l'inflammation. De plus, chez le sujet âgé, une fréquence importante des infections est reportée. Cette prévalence aux infections est associée à une réponse inflammatoire inappropriée chez le sujet fragile. Dans ce contexte, il est important de lutter contre l'inflammation chronique au cours du vieillissement afin de restaurer une réponse inflammatoire efficace permettant au sujet fragile d'éliminer l'agent infectieux.

Dans ce projet, nous souhaitons évaluer l'activité anti-inflammatoire et anti-oxydante nutraceutiques seuls ou en association sur un modèle de maladies inflammatoires digestives (MICI), évaluer l'impact de ces nutraceutiques sur l'inflammation chronique, le stress oxydant et la sarcopénie au cours du vieillissement et sur la capacité de réponse à une infection fongique au cours du vieillissement. Les modèles expérimentaux murins utilisés, modèle de MICI (maladie de Crohn et rectocolite hémorragique), sont des modèles décrits et validés dans la littérature. L'ensemble de cette étude comprendra 1344 souris et 216 rats.

La règle des 3R sera appliquée dans le cadre de ce projet. Les procédures font l'objet d'un suivi du bien-être des animaux adaptés à l'expérience et aux potentiels effets indésirables des procédures sur l'état de santé global des animaux. Les souris seront surveillées quotidiennement et le suivi du poids, prostration, apathie, ventilation, comportement, aspect des poils, piloérection une fois par semaine ou quotidiennement selon la procédure. Les expériences sont organisées de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux. L'innocuité et la toxicité de nutraceutiques seuls ou en association seront déterminées *in vitro* par l'évaluation de leur cytotoxicité sur macrophages murins et humains. Une gamme de concentrations des extraits seuls et des préparations sera testée également sur les fonctions microbicides, inflammatoires et oxydantes des macrophages afin de sélectionner les plus pertinents pour les études chez l'animal. Des études précédentes ayant obtenus une autorisation du ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche nous ont permis de maîtriser ces modèles murins permettant de réduire le nombre d'animaux et de mieux appréhender les points limites pour le bien-être des animaux. De plus, nous avons également pu valider certaines approches expérimentales *in vitro* permettant d'optimiser l'utilisation des animaux.

15088 La leishmaniose viscérale est une maladie parasitaire due au parasite *Leishmania infantum*. Elle sévit surtout dans les régions tropicales et subtropicales ainsi que dans le sud de la France plus

particulièrement autour du bassin méditerranéen. Elle se caractérise par des poussées de fièvre irrégulières, une perte de poids, des hémorragies, des infections récurrentes et un décès en absence de traitement. Le traitement de la leishmaniose viscérale constitue une réelle difficulté thérapeutique dû aux coûts élevés et à la grande toxicité des molécules utilisées, ainsi qu'à l'apparition de résistances. Les macrophages, cellules immunitaires clés dans les réponses inflammatoires, jouent un rôle essentiel lors de l'infection à *Leishmania*. En effet, après inoculation, les parasites vont rapidement être reconnus et internalisés par les macrophages. La présence du parasite dans les macrophages le rend alors invisible au système immunitaire et l'infection progresse dans l'organisme.

L'objectif de notre étude sera de mettre en évidence dans des modèles expérimentaux de leishmaniose, chez la souris, déjà décrits dans la littérature, les caractéristiques fonctionnelles et phénotypiques des macrophages au cours de la progression de la leishmaniose viscérale.

Une approche pharmacologique visant à moduler les fonctions des macrophages sera ensuite mise en place. Les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'effet de ces agents pharmacologiques sur la progression de l'infection seront explorés grâce à des souris spécifiquement invalidées au niveau des macrophages pour des facteurs modulant leur fonction. Ce travail s'inscrit dans la stratégie de développer de nouvelles cibles thérapeutiques innovantes permettant de lutter contre l'infection à *Leishmania infantum*.

Ainsi, nous prévoyons 6 souris par lot (souris jeunes et âgées) que nous infecterons par injection intrapéritonéale avec *Leishmania infantum* (durée de l'infection 15 et 60 jours).

Dans un premier temps, nous identifierons les voies de signalisation impliquées dans l'effet microbicide des macrophages en comparant des souris sauvages et des souris présentant des macrophages invalidés pour ces différents acteurs. Il y aura 1 lot de souris sauvages et 1 lot de souris invalidées pour chaque génotype de souris (84 souris). L'expérience sera faite 3 fois (252 souris) et également sera réalisée 2 fois sur des souris âgées (168 souris).

Ensuite nous étudierons l'implication des différents acteurs immunitaires (macrophages et lymphocytes) sur le génotype de souris transgéniques qui aura été sélectionné en amont en déplaçant soit les macrophages par injection intrapéritonéale avec un traitement pharmacologique soit les lymphocytes grâce à des souris génétiquement invalidées ou traitées par injection intrapéritonéale d'anticorps neutralisants anti CD4/CD8 (10 lots soit 60 souris). L'expérience sera faite 3 fois (180 souris) et 2 fois sur des souris âgées (96 souris)

Puis nous modulerons les fonctions des macrophages en ciblant les facteurs que nous aurons identifiés dans les étapes précédentes par injection intrapéritonéale d'agents pharmacologiques. Il y aura 1 lot de souris sauvages non traitées et 1 lot de souris sauvages traitées. L'expérience sera faite 3 fois (108 souris) et également sera réalisée 2 fois sur des souris âgées pour l'agent pharmacologique sélectionné à 1 dose (24 souris).

Afin de suivre le développement de l'infection, les souris seront anesthésiées pour prélever du sang 1 fois par semaine et avant euthanasie pour 15 jours d'infection et 1 fois toutes les 2 semaines pour 60 jours d'infection. Il n'y a pas de possibilité de réaliser un traitement anti-douloureux car les macrophages sont des cellules très plastiques qui changent de phénotype en fonction des conditions microenvironnementales. L'utilisation d'un traitement anti-douloureux pourrait donc biaiser les données. Les animaux seront surveillés quotidiennement et seront euthanasiés si la prise de poids est supérieure à 40% ou si la perte de poids est supérieure à 20% du poids initial et si les animaux présentent des signes de mutilations, des difficultés respiratoires ou restent prostrés.

L'ensemble de cette étude comprendra 1700 souris C57BL/6 sauvages ou génétiquement modifiées.

15089 Les produits de glycation avancée (AGE), et parmi eux la carboxyméthyl-lysine (CML), sont impliqués dans les maladies associées à l'âge et dans les phénomènes inflammatoires. Ces AGEs sont présents à des niveaux élevés dans les aliments transformés. L'exposition à la CML alimentaire, à la fois pendant la période précoce de la vie et plus tard dans la vie adulte, soulève des questions quant à ses effets pour la santé.

L'objectif du projet est donc de déterminer si une exposition à la CML au début de la vie ou tout au long de la vie participe à l'installation de l'inflammation et accélère le processus de vieillissement, puis de déterminer si ces effets pourraient être induits par la liaison de la CML à son récepteur (RAGE). Ce projet est soutenu par des financements publics obtenus après un avis favorable d'experts scientifiques dans le cadre d'un appel à projet.

Ce projet s'inscrit dans un programme de recherche plus large dans lequel, dès que cela est possible, les études seront menées sur des cultures cellulaires afin de respecter les exigences de remplacement. Les études qui seront menées sur l'animal sont uniquement celles ne pouvant pas être remplacées. En effet, certains aspects du projet ne peuvent pas être étudiés avec des cultures cellulaires car étudier le processus de vieillissement et les mécanismes inflammatoires fait intervenir plusieurs systèmes physiologiques sur une période longue. Il est donc nécessaire de comprendre la réaction d'un organisme entier pour évaluer les effets de ce composé néoformé.

Le modèle animal choisi sera la souris car c'est un modèle reconnu pour étudier le vieillissement et pour lequel il y a le plus de données dans la littérature. Les souris seront exposées à la CML pendant la période précoce (in utero et jusqu'à 6 semaines de vie) ou tout au long de leur vie. Nous utiliserons des souris de fond génétique C57bl6 invalidées pour le RAGE (RAGE^{-/-}) et des souris de même fond génétique non invalidées pour le RAGE (RAGE^{+/+}) afin de déterminer le rôle de RAGE dans les phénomènes inflammatoires et le vieillissement. De plus, il a déjà été démontré que les souris RAGE^{-/-} présentent un ralentissement du vieillissement.

Des couples RAGE^{+/+} ou RAGE^{-/-} seront mis en reproduction. Puis les femelles seront exposées ou non à la CML pendant la gestation et la lactation, ce qui permettra d'exposer leurs descendants. L'exposition des descendants se poursuivra jusqu'à 6 semaines ou tout au long de la vie. Les couples reproducteurs seront gardés en vie. Les descendants seront mis à mort à 6 semaines, 35 semaines ou 70 semaines afin de prélever leurs organes pour les analyses ultérieures.

Afin de minimiser les souffrances des animaux et d'améliorer leur bien-être, les animaux seront hébergés dans des conditions d'atmosphère et de température contrôlées dans des cages adaptées à leurs besoins physiologiques et seront manipulés par du personnel formé et expérimenté. Les animaux seront exposés à un cycle jour/nuit de 12 h/jour et auront accès à volonté à de la nourriture et à de l'eau pendant la durée des expériences. La nourriture fournie respectera leurs besoins physiologiques. Des éléments leur offrant la possibilité de nidifier, de se cacher ou de faire de l'exercice seront systématiquement aménagés dans les cages et régulièrement renouvelés. Les animaux seront placés dans des cages adaptées à leur taille et au nombre. Durant toute la durée du protocole, les animaux seront suivis quotidiennement, l'apparition de signes de souffrance (prostration, vocalisation, perte de poids supérieure à 20%) sera considérée comme point limite et nous procéderons alors à la mise à mort précoce des animaux selon la méthode que nous avons déclarée

L'étude expérimentale est une étude originale, réalisée pour la première fois. Cette étude n'est donc pas la répétition d'études identiques antérieures.

Le nombre d'animaux choisis correspond au nombre minimum d'animaux par lot (8 à 16 souris par lot) nécessaire pour atteindre une puissance statistique pertinente, soit 225 souris pour les 3 ans de projet 22 femelles reproductrices + 11 mâles reproducteurs (parents) + 4 lots de 8 souris + 10 lots à 16 souris.

Compte tenu des objectifs de l'étude et des contraintes expérimentales, nous avons pris toutes les mesures nécessaires pour respecter la règle des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement).

15090 L'allergie alimentaire est une réaction immunitaire disproportionnée qui survient après l'ingestion d'un aliment particulier. Elle se manifeste par une inflammation brutale causant des symptômes respiratoires, cutanés ou digestifs. Les formes les plus graves sont le choc anaphylactique et l'oedème de Quincke pouvant entraîner jusqu'au décès du patient. L'allergie alimentaire se déclare en deux temps. Lors du premier contact avec l'allergène, l'organisme est sensibilisé. Cette phase est asymptomatique mais génère une production d'immunoglobulines IgE spécifiques de l'allergène.

Le deuxième contact avec l'aliment va conduire à l'activation des cellules immunitaires par les IgE et vont libérer des médiateurs inflammatoires.

L'allergie alimentaire touche environ 6% des enfants et 3% des adultes et la prévalence n'a fait qu'augmenter au cours de la dernière décennie.

A l'heure actuelle aucun traitement ne permet d'éviter l'allergie alimentaire si ce n'est de bannir l'allergène de son alimentation. Les manifestations les plus graves nécessitent une prise en charge médicale rapide notamment grâce à l'injection d'adrénaline permettant un soulagement des symptômes.

La recherche menée ici a pour objectif de tester de futurs candidats médicaments ou substituts alimentaires qui pourront permettre de mieux prendre en charge cette pathologie et de la traiter de façon durable. Il est donc important de pouvoir disposer de modèles expérimentaux permettant une meilleure compréhension et analyse des mécanismes physiopathologiques impliqués dans le développement de ces maladies inflammatoires ainsi que l'efficacité de nouvelles molécules thérapeutiques visant à améliorer la santé des patients. Pour cela nous proposons un modèle de sensibilisation avec de l'ovalbumine comme allergène supplémenté avec de la toxine cholérique ayant le rôle d'adjuvant. Après une période de sensibilisation de 7 semaines, les animaux seront challengés par voie orale avec l'allergène recréant ainsi le processus allergique observé chez l'Homme.

Dans le respect de la règle des 3R, et lorsque cela est possible ces candidats sont évalués sur culture cellulaire ou organe isolé préalablement aux tests sur les animaux afin de remplacer ou de réduire le nombre d'animaux impliqués dans les protocoles. Nous utiliserons le nombre minimum de souris nécessaire à une analyse statistique en prenant en compte la variabilité inter-individuelle. D'autre part, un raffinement des protocoles sera effectué en fonction des avancées technologiques dans le domaine. Les souris sont hébergées selon les conditions de la nouvelle réglementation 2010/63/UE en unités individuelles ventilées avec enrichissement de l'environnement (composants de nidification et igloo). Chaque animal entrant dans une étude disposera d'une fiche individuelle de suivi sur laquelle tout traitement et observation seront reportés. L'état de santé des animaux sera évalué quotidiennement selon des critères d'apparence physique (perte de poids significative, gêne respiratoire) et comportementaux (souris prostrée, agressivité) définis en accord avec le comité de suivi du bien-être animal de notre établissement. Une dégradation trop importante de l'état de santé (au delà d'un score de 7 selon les critères détaillés dans les procédures expérimentales) pourra entraîner l'arrêt immédiat de l'expérimentation. Certains critères suffiront à eux seuls à l'arrêt de l'expérience, telle qu'une perte de poids trop importante ou la suffocation de l'animal.

Ce protocole nécessite 56 animaux. A raison de 2 études par an, nous utiliserons 560 animaux sur l'ensemble du projet.

15091 Le cancer du sein (CS) est le cancer féminin le plus fréquent. Il affecte plus de 1.7 millions de femme dans le monde et environ 600 000 patientes meurent chaque année de cette maladie dans le monde. Nous avons caractérisé un « suppresseur de tumeur » qui active le système immunitaire (SI). Du fait de l'importance du SI dans la réponse anti-tumorale chez le patient, l'étude de ce suppresseur, de sa cible et du mécanisme d'action mis en jeu pour activer le SI paraît un enjeu important pour proposer des alternatives thérapeutiques pour contrer la résistance aux traitements utilisés en clinique. Pour évaluer la pertinence de ces découvertes et de leur action dans un système intégré, nous devons étudier les effets anti tumoraux de cette molécule ainsi que son action sur le SI *in vivo* chez des souris greffées ou non avec des tumeurs mammaires. Ces études seront réalisées chez des souris et nécessiteront un nombre total de 2286 souris.

Afin de respecter la règle des 3R et réduire le nombre d'expériences et d'animaux et remplacer les animaux pour d'autres expérimentations et raffiner les expériences au regard de l'éthique animale, des expériences *in vitro* sur cellules ont été préalablement réalisées pour caractériser les effets anti-tumoraux de cette molécule ainsi que son action sur les cellules du SI. De plus, le nombre de souris utilisées sera le nombre minimal d'animaux qui permettra d'avoir des résultats significativement exploitables et les lignées choisies sont représentatives des sous-types de cancers mammaires.

Les animaux utilisés au cours de cette expérience seront maintenus dans des conditions optimales avec une surveillance régulière de leur bien-être et un enrichissement du milieu. Les animaux auront un suivi clinique quotidien (observations, manipulation/palpation, état général, pesée) afin d'intervenir rapidement si les animaux manifestent des signes de douleur. Si une souffrance est observée, un traitement sera mis dans l'eau de boisson pour éliminer la douleur sous prescription du vétérinaire de l'animalerie.

15092 Les accidents vasculaires cérébraux (AVC), sont une cause majeure de handicap à long terme. Une étude en imagerie par résonance magnétique (IRM) que nous avons récemment réalisée sur plus de 400 patients victimes d'un AVC a indiqué que du fer s'accumule au sein des réseaux que l'AVC a lésés et particulièrement dans le thalamus. Nos données suggèrent fortement que l'excès de fer dans ces régions a un impact péjoratif sur l'évolution clinique. Autrement dit, plus l'accumulation de fer dans le thalamus est importante dans les suites d'un AVC et plus la récupération risque d'être mauvaise. Ainsi, nous faisons l'hypothèse, qu'à terme, éviter l'accumulation de fer par des traitements chélateur du fer pourrait protéger les réseaux déconnectés par l'AVC et ainsi avoir un impact neuroprotecteur.

Avant d'envisager un essai thérapeutique chez l'homme, il convient de prouver chez l'animal que du fer s'accumule progressivement dans les suites d'un AVC et que celui-ci induit des dommages cellulaires. Il convient également d'apporter des premiers éléments sur l'effet possible du traitement chélateur. Ce projet vise donc à quantifier le fer et les dommages cellulaires induits par l'excès de fer au sein du thalamus sur un modèle murin d'AVC très peu invasif touchant une partie du réseau dans lequel le thalamus est impliqué. Nous testerons ensuite un médicament chélateur visant à diminuer la charge en fer. Pour réaliser cette étude, 160 souris C57BL/6J seront utilisées. L'AVC sera induit par la méthode de photo-thrombose chez la souris qui est actuellement la méthode la moins invasive pour reproduire la pathologie humaine. Il n'existe actuellement pas de modèle *in vitro* et donc pas de méthode alternative permettant de REMPLACER les animaux. Afin de respecter la règle des 3R, nous avons REDUIT à 160 le nombre total d'animaux que nous prévoyons d'utiliser sur une période de 36 mois. Il s'agit du nombre minimal d'animaux nécessaire à l'obtention de données de qualité exploitable et permettant une analyse statistique fiable.

Nous utiliserons l'IRM pour quantifier le fer chez les souris comme on peut le faire chez l'homme. Un des avantages majeurs de l'IRM est d'être non-invasive et ce qui permet de suivre un animal dans le temps. Un premier lot de 16 animaux sera ainsi utilisé pour la mise au point des méthodes IRM. Ensuite, nous utiliserons 3 groupes supplémentaires de 48 animaux. Le premier groupe visera à suivre l'évolution de la charge en fer mesurée en IRM à 2 semaines, 4 semaines et 7 semaines après l'AVC (groupe photo-thrombose) par comparaison à un groupe contrôle sans AVC. A chaque point temporel, un certain nombre d'animaux sera sacrifié pour mesurer les conséquences tissulaires de l'accumulation de fer par histologie et pour vérifier les mesures de fer grâce à la méthode de référence appelée spectroscopie de masse. Si nous reproduisons bel et bien l'accumulation de fer dans le thalamus avec des altérations tissulaires associées nous testerons les effets d'un chélateur du fer en reconduisant les mêmes mesures sur un groupe recevant le traitement de façon quotidienne à partir de J2 et un groupe recevant le placebo. Des mesures de RAFFINEMENT seront mises en place durant toute la durée du projet. Les animaux seront hébergés au sein d'un établissement utilisateur agréé dans des conditions d'hébergement favorisant leur bien-être (enrichissement, suivi quotidien par du personnel qualifié). Enfin, des points-limites ont été établis entraînant une prise en charge de l'animal afin d'anticiper toute souffrance et réduire au mieux l'inconfort des animaux (anesthésie, analgésie, gel oculaire, tapis chauffant.).

15093 La maladie alcoolique du foie (MAF) est l'une des principales causes de mortalité liée au foie dans le monde. Contrairement aux avancées récentes en matière de traitement des hépatites virales, il existe un manque important d'options thérapeutiques pour les patients atteints de MAF. Cela est particulièrement vrai pour l'hépatite alcoolique (HA) où il est urgent de développer des thérapies efficaces. L'HA est la forme la plus grave de maladie alcoolique du foie. Compte tenu du risque élevé de décès prématurés (taux de mortalité de 40%), il est nécessaire de progresser dans la

compréhension de la physiopathologie de la maladie afin de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques.

Des modèles animaux ont été proposés pour faciliter la dissection des mécanismes impliqués dans la MAF. Cependant, aucun des modèles animaux développés jusqu'à présent pour l'étude de la MAF n'est capable, à lui seul, de reproduire tout le spectre de l'HA infiltrats de cellules immunitaires (neutrophiles), défaut de régénération du foie, fibrose.

La compréhension et le développement de traitements innovants nécessitent cependant le recours à l'expérimentation animale. C'est pourquoi pour ce projet nous avons besoin d'utiliser 4 modèles animaux permettant d'évaluer les différents aspects de la maladie.

Ce projet a pour but d'explorer de nouvelles cibles thérapeutiques et de tester des candidats médicaments pour la prise en charge des patients atteints de MAF en général et d'HA en particulier.

Ces évaluations précliniques n'interviennent qu'après avoir évalué, sélectionné et caractérisé rigoureusement *in vitro* de nouvelles cibles potentielles impliquées dans la physiopathologie de la MAF et notamment d'HA afin de limiter au mieux le nombre d'animaux (Réduire). Cependant, il est nécessaire d'étudier la physiologie intégrée et complexe du dialogue entre le système immunitaire et le système digestif (Remplacer) et ceci nécessite donc le recours à des modèles *in vivo* de régénération hépatique, de fibrogénèse et de stéatose alcoolique largement décrits et reconnus par la communauté scientifique.

Les procédures sont définies au mieux pour offrir le maximum de confiance dans les résultats générés dans le respect du bien-être des animaux en limitant la souffrance animale (Raffiner).

Le nombre total d'animaux sur les 5 ans à venir est estimé au maximum à 6 990 souris, répartis en 4 procédures qui doivent être considérées comme indépendantes les unes des autres.

- 15094** L'Accident Vasculaire Cérébral (AVC) conduit fréquemment à la perte de neurones du cortex moteur qui forment le faisceau corticospinal (FCS), structure clé dans le contrôle du mouvement volontaire. L'AVC est de fait la première cause de handicap acquis à l'âge adulte, et un enjeu majeur de la santé publique. Les thérapies existantes reposent majoritairement sur l'augmentation de la plasticité cérébrale. Toutefois, l'efficacité limitée des traitements pharmacologiques et de la rééducation motrice soulignent la nécessité de développer des stratégies innovantes pour améliorer la régénération tissulaire après une lésion du cortex moteur. Afin de mimer les effets délétères d'un AVC, nous avons mis au point un modèle basé sur l'injection ciblée d'une toxine qui crée une lésion cérébrale. Cela nous permettra d'évaluer l'efficacité d'une nouvelle stratégie thérapeutique à base de bioimplants (hydrogels et prothèses structurées) sur la récupération motrice chez l'animal. Le cœur du projet vise à créer une technologie générique pour améliorer la réparation tissulaire après une atteinte dans le système nerveux central. L'idée principale de ce travail est la mise au point d'un système implantable dans le cerveau, dont le but est de régénérer des fibres d'un faisceau corticospinal endommagé. Les objectifs sont 1/ de mettre à profit les potentialités régénératrices (neurogenèse) des cellules souches du cerveau adulte, en fournissant au sein de la lésion, un support structuré qui crée un microenvironnement plus permissif au recrutement et surtout à la survie de cellules souches endogènes 2/ de fournir des cellules neuronales et gliales adultes, qui peuvent aider la régénération au niveau de la lésion. Concrètement, nous implanterons au niveau de la lésion des biomatériaux combinés avec un hydrogel pour espérer recréer des fibres motrices fonctionnelles. Dans l'espoir d'augmenter encore la régénération tissulaire, nous cultiverons sur les implants des cellules adultes neuronales et non-neuronales (gliales), issues de lignées cellulaires ou isolées à partir de l'intestin de l'animal, qui s'ajouteraient à la neurogenèse endogène pour recréer des fibres motrices. Un protocole similaire a déjà eu une autorisation sur le rat testant la greffe de cellules souches neuronales sur des implants en silicone. L'étape suivante prévoit l'autogreffe de cellules souches ou adultes neuronales et gliales isolées à partir de l'intestin de rats à travers procédure d'appendicectomie. Enfin, nous effectuerons un suivi *in vivo* de la greffe/implant par IRM. Pour se rapprocher de la pratique clinique, nous privilégions l'examen de l'intégrité du tissu cérébral par Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) *in vivo*. Cette technique présente l'avantage d'être non invasive, et est indispensable pour suivre la dégénérescence des tissus lésés,

déterminer le volume lésionnel, et suivre l'effet bénéfique potentiel d'une greffe sur l'architecture tissulaire. Les animaux seront évalués pré-lésion, à 24h, et 3 mois. Ils seront anesthésiés pendant toute la durée de l'examen pour assurer leur immobilité et éviter un stress inutile. Un groupe d'animaux aura une imagerie Tomographie par émission de positons (TEP), qui est la seule technique non-invasive qui permet de savoir si les cellules greffées sont vivantes 3 mois après la greffe. A la fin du suivi comportemental et d'imagerie, les animaux seront mis à mort et le tissu cérébral sera analysé par histologie. L'analyse caractérisera la perte de neurones et de fibres myélinisées, l'inflammation, et en particulier la nature du tissu reconstruit autour des implants. Dans le cadre d'une implantation de biomatériau + cellules adultes neuronales et gliales, la survie et la formation de nouveaux neurones seront analysées. Le bénéfice de notre stratégie thérapeutique de bio-implants (avec ou sans cellules) sur la récupération fonctionnelle de la motricité doit être évaluée sur des animaux vivants. La force d'agrippement, et la motricité des animaux seront testés sur le long terme grâce à des tests appropriés, sur des animaux entraînés. Ce protocole est invasif et nécessite de montrer son efficacité sur un ou deux modèles animaux avant d'être essayé chez l'homme. Le modèle utilisé sera le rat. En accord avec la règle « Réduire » des 3Rs, les données d'IRM de protocoles précédents seront exploitées, en particulier, les groupes contrôles. Nous prévoyons 140 animaux sur 5 ans. Les rats sont hébergés dans un portoir ventilé, 2 ou 3 par cage, dans une pièce réservée aux rats et contenant un autre portoir. L'alimentation est donnée ad libitum, y compris pendant les phases d'entraînement et d'évaluation moteurs. Le suivi de l'état de santé général de l'animal est assuré par le personnel de zootechnie, les animaux sont pesés toutes les semaines et bénéficient de contrôles vétérinaires réguliers. Une attention minutieuse est apportée aux animaux opérés, qui sont monitorés quotidiennement par le personnel de zootechnie et les expérimentateurs munis de l'habilitation à l'expérimentation animale niveau Concepteur (observation de l'appétit, du poids corporel, de la mobilité, de l'état du pelage et du comportement).

15095 L'arthrite rhumatoïde est une maladie inflammatoire aigüe affectant 1% de la population. C'est une maladie dite auto-immune des anticorps appelés « auto-anticorps » s'attaquent aux articulations qui gonflent, deviennent douloureuses et vont se déformer réduisant ainsi leur amplitude de mouvement. De nombreux traitements existent pour combattre les crises ou la maladie de fond, mais ces traitements sont très chers et induisent de nombreux effets indésirables au long terme.

Ce projet a pour but de produire un stock de sérum (liquide sanguin dépourvu de ses cellules et protéines de coagulation) induisant l'arthrite rhumatoïde permettant de tester de nouveaux médicaments anti-inflammatoire dans le cadre d'un projet d'étude en cours de validité. L'arthrite rhumatoïde est induite chez l'animal par injection de sérum de souris K/BxN, riche en auto-anticorps. Ces souris K/BxN développent spontanément une arthrite à l'âge de 3-5 semaines et sont prélevées à l'âge de 9 semaines, lorsqu'il y a accumulation d'auto-anticorps, soit au pic de la maladie. Les signes cliniques de la maladie sont un gonflement et une rougeur des articulations, visible sur les poignets et les chevilles de l'animal, induisant des douleurs articulaires. Le niveau de douleur pouvant être ressenti par l'animal se traduit par une mobilité réduite parfois immobilité et donc une incapacité à se nourrir. Pour prévenir une forte perte de poids, les animaux K/BxN sont pesés 2 fois/semaine dès l'apparition des signes cliniques, soit 3-5 semaines de vie et des croquettes humides sont déposées aux fond de la cage.

Le but étant d'obtenir une forte réponse inflammatoire et donc un sérum efficace, les analgésiques ne peuvent être utilisés ici, ils diminueraient la réponse inflammatoire et impliqueraient l'utilisation de souris supplémentaire pour l'obtention de plus de sérum qui a une plus grande quantité deviendrait aussi efficace qu'un sérum obtenu à partir d'une réponse inflammatoire forte.

Le sérum est obtenu après centrifugation du sang prélevé de la souris K/BxN, sous anesthésie gazeuse à l'isoflurane (2.5-3%), puis sera déposé dans un tube contenant de l'héparine (anti-coagulant) et centrifugé afin d'en extraire le sérum. Les animaux sont mis à mort immédiatement après le prélèvement par dislocation. Le sang est prélevé au niveau du sinus retro-orbital car on obtient un sérum de meilleur qualité.

Afin d'effectuer des études sur le modèle de l'arthrite rhumatoïde, nous souhaitons produire notre propre sérum obtenu grâce à des souris transgéniques K/BxN développant spontanément l'arthrite.

Ces souris sont obtenus grâce au croisement suivant KRN-T cell receptor transgenic (Tg) (KRN-TCR Tg)xNOD/ShiLtJ

Les facteurs génétiques et mécanismes moléculaires chez les souris K/BxN impliqués dans le développement spontané de l'arthrite rhumatoïde ne sont pas encore entièrement élucidés. Il n'est pas possible de produire par des méthodes *in vitro* un sérum efficace et permettant l'obtention des symptômes reflétant la réalité de la pathologie pour l'étude du modèle de l'arthrite rhumatoïde.

Les souris NOD/ShiLtJ utilisées pour l'accouplement présentent un phénotype dommageable vers l'âge de 3 mois. Elles développent un diabète entre la 12ème et 25ème semaines de vie. C'est pourquoi ces souris sont renouvelées avant l'apparition du diabète. Afin de prévenir une apparition du diabète, les souris sont pesées 2 fois/semaines (prise alimentaire) et observées quotidiennement pour prévenir une éventuelle souffrance, ou les signes visibles du diabète, c'est-à-dire une forte consommation en eau (changement de biberon plus régulier que d'habitude) et une miction importante (litière sale très rapidement, soit environ 2jours au lieu de 7). De plus, partir de leur 11ème semaine de vie, le taux de glucose (pour déceler un éventuel diabète) est testé sur des bandelettes de contrôle de glycémie permettant de renouveler les souris femelles NOD/ShiLtJ avant l'apparition du phénotype dommageable. Les souris KRN-TCR Tg se développent normalement, ne sont pas immunodéficientes et ne présentent pas de phénotype dommageable.

Pour ce projet 3 trios par lignées non expérimentaux sont nécessaires pour créer les noyaux de production et leur renouvellement au cours du projet. Les mâles F1 KRN-TCR transgéniques seront renouvelés tous les 4 mois. C'est-à-dire 9 mâles KRN-TCR Tg/an soit 45 mâles KRN –TCR Tg pour 5 ans, ne présentant pas de phénotype dommageable. Et un renouvellement tous les 3 mois des femelles NOD/ShiLtJ, car celles-ci déclarent un diabète entre la 12ème et la 25ème semaines de vie, elles sont accouplées à l'âge de 6semaines et séparées des mâles à l'âge de 12 semaines, ce qui représente 120 femelles NOD/ShiLtJ pour 5 ans, ne présentant pas de phénotype dommageable durant le croisement. Pour maintenir la lignée, il faut 3 trios de KRN-TCR Tg ce qui représente 48 petits/mois environs. Soit 2880 animaux K/BxN maximum sur 5 ans.

A ce jour, l'animal de laboratoire reste le seul recours pour obtenir du sérum contenant les auto-anticorps nécessaires pour induire l'arthrite. Ce projet sera réalisé en respectant les principes fondamentaux de l'expérimentation animale

-Remplacement le modèle animal est fondamental dans notre cas, puisque l'obtention de sang et donc de sérum ne peut se faire qu'à partir un organisme vivant entier.

-Raffinement Pour limiter la douleur, les animaux sont anesthésiés lors du prélèvement de sang. Les animaux sont observés quotidiennement pour respecter leur bien-être et éviter au maximum une possible douleur durant leur hébergement par l'utilisation d'une grille de score clinique. Des points limites adaptés et prédictifs sont mis en place.

-Réduction Le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum nécessaire pour obtenir une quantité suffisante de sérum induisant l'arthrite. Nous souhaitons réaliser un stock de sérum, sachant qu'une souris K/BxN permet l'obtention de 200µL de sérum. Le volume de sérum nécessaire pour induire l'arthrite à une souris naïve est 250µL.

15096 Les cellules beta produisent l'insuline, hormone indispensable à l'homéostasie glucidique. Evaluer la masse beta pancréatique fonctionnelle chez l'Homme représente un sujet d'intérêt majeur puisque la connaître permettrait d'une part de suivre l'évolution de la maladie diabétique d'autre part d'évaluer l'efficacité d'actions thérapeutiques. De récents travaux laissent supposer qu'il existerait une relation étroite entre l'augmentation de l'afflux de sang dans le pancréas et la masse beta fonctionnelle. L'objectif global du présent projet est d'évaluer cette corrélation sur rongeur en utilisant l'échographie par doppler ultrasensible, qui est une approche d'imagerie fonctionnelle innovante, non invasive et reproductible, et ce, avant une éventuelle application chez l'homme.

Pour ce faire nous testerons notre méthode d'imagerie sur des rats adultes qui auront, ou non, été préalablement rendus diabétiques par une méthode chimique ou par une chirurgie. Dans ces deux cas nous réduirons au mieux la douleur et le mal être en maintenant les animaux sous anesthésie générale avec une analgésie. Pour tous les animaux une seule anesthésie sera réalisée et tous les

gestes invasifs seront réalisés durant celle-ci. L'imagerie sera réalisée à la suite de sorte que les animaux ne sortiront pas de l'anesthésie jusqu'à la fin de l'expérimentation ce qui réduira le stress et l'inconfort.

Durant toute l'application de notre protocole, afin de garantir le bien-être des animaux utilisés, nous appliquerons la règle de 3R (réduire, raffiner et remplacer)

Le nombre de rats utilisés dans notre projet est réduit à son minimum dans la limite de ce qui est requis pour obtenir des résultats scientifiques et statistiques valides. Le projet inclura au maximum 50 animaux. Les conditions d'hébergement, de soins ainsi que les méthodes utilisées seront optimisées afin de réduire au maximum douleur, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux. Raffinement Les gestes de chirurgie nécessaires à certaines procédures seront limités au maximum, réalisés sous anesthésie pour éviter toute douleur et pratiqués par des spécialistes de ce type d'opérations. Durant toute l'étude les animaux seront surveillés régulièrement (des points limites très précis ont été établis pour toutes les étapes de cette étude). Enfin, puisqu'il n'existe pas de modèle in-vitro pouvant étudier de façon intégrée l'interaction complexe entre la glycémie et la réponse pancréatique, il n'est pas possible de remplacer le modèle animal dans ce projet.

L'espoir de ce protocole de recherche est de développer, chez l'Homme, une technique d'imagerie fonctionnelle innovante et non invasive permettant l'évaluation précise de la réserve endocrine du pancréas.

15097 L'obésité dont l'incidence ne cesse d'augmenter dans notre société, est un problème majeur de santé publique. En effet, l'obésité est un facteur de risque pour le développement de maladies cardio-métaboliques dont le diabète de type 2 (DT2). L'obésité est caractérisée par une augmentation excessive de la masse de tissu adipeux (TA) qui participe au contrôle de la glycémie d'un individu. Le développement excessif du TA provoque un changement des cellules immunitaires au sein du TA, tel que les macrophages, conduisant à une inflammation du TA. Cette inflammation perturbe alors les fonctions des adipocytes du TA et participe au développement du DT2. L'analyse de données de la littérature montrent que les macrophages du TA de patients obèses et diabétiques ont une augmentation de l'activation d'une protéine anti-oncogène par rapport aux patients obèses et non-diabétiques, et que l'expression et de l'activation de cette protéine était augmentée dans les macrophages du TA de souris obèses comparé aux souris mince. Nous voulons donc déterminer l'impact de l'inactivation de cette protéine dans les macrophages sur la fonction des macrophages et sur le développement de l'obésité et des complications métaboliques chez la souris. Aucune étude publiée à ce jour n'a exploré le rôle de cette protéine dans les macrophages dans le contexte du DT2. Pour cela, nous devons inhiber cette protéine dans les macrophages d'un organisme entier (la souris). En effet, les macrophages récupérés à partir de cultures cellulaires *in vitro* (cellules « élevées » en dehors de l'organisme) sont imparfaites. Nous avons donc besoin de cellules obtenues directement à partir de souris n'exprimant plus notre protéine d'intérêt dans les macrophages pour aborder notre problématique. De plus, la caractérisation des conséquences métaboliques ne peut se faire que sur un organisme entier. Nous utiliserons deux modèles complémentaires

Procédures 1 et 2 : Nous utiliserons un modèle de souris génétiquement modifiée d'inactivation de cette protéine spécifiquement dans les macrophages. Nous soumettrons les souris à un régime riche en lipides et déterminerons les conséquences sur la prise de poids et les conséquences sur le contrôle de la glycémie. Ce travail nous permettra de déterminer si l'inactivation de cette protéine dans les macrophages permet de prévenir le développement de l'obésité ou/et des complications métaboliques associées à l'obésité. Si c'est le cas, dans la procédure 2 nous chercherons à comprendre le rôle et les effets de cette protéine dans les macrophages du tissu adipeux.

Procédure 3 : Nous déterminerons également si l'inactivation de cette protéine chez des souris déjà obèses corrige les défauts glycémiques de ces souris. Pour cela nous invaliderons cette protéine spécifiquement dans les macrophages du tissu adipeux de souris obèses. Nous traiterons les souris obèses avec des particules permettant de diminuer l'expression de cette protéine spécifiquement les macrophages du tissu adipeux de souris.

L'ensemble de ce travail nous permettra de découvrir si cette protéine est impliquée dans l'apparition des désordres glycémiques chez la souris obèse, et si l'inhibition de cette protéine est à considérer pour le traitement du DT2. Au final ce projet présentera un rapport avantages/dommages positif puisqu'il doit contribuer à améliorer nos connaissances des mécanismes moléculaires impliqués dans le développement des pathologies associées à l'obésité chez l'homme en utilisant (i) un modèle établi de souris (fond génétique C57Bl6) qui ne présente pas de phénotype dommageable, (ii) des procédures expérimentales qui n'affectent que faiblement les conditions de vie de l'animal, et (iii) une stratégie par étape successive de validation qui limitera l'utilisation d'animaux si les effets biologiques sont différents de ceux attendus. Ce projet nécessitera un maximum de 792 souris pour l'ensemble des procédures.

La règle des 3Rs est donc prise en compte ici de la façon suivante. Pour satisfaire à la réduction, la procédure prévoit d'utiliser le nombre minimum d'animaux nécessaires à des études statistiques pertinentes. Pour le raffinement, l'hébergement sera réalisé dans des locaux appropriés et les personnes réalisant les procédures sont autorisées et appliqueront les règles d'éthiques. L'environnement sera enrichi pour diminuer le stress. Le suivi sanitaire régulier permettra d'identifier, le plus rapidement possible, les souris souffrantes et de prendre les mesures nécessaires. Enfin, conformément au principe de remplacement, notre hypothèse a été précédemment éprouvée *in vitro*. Il nous faut maintenant l'étudier dans un contexte plus physiologique, or il n'existe pour l'instant pas de modèle *in vitro* qui pourrait remplacer l'expérimentation sur un organisme entier.

15098 Ce projet concerne l'utilisation d'animaux à des fins de formation du personnel aux gestes techniques de l'expérimentation animale.

Ces gestes incluent les injections (intramusculaire, intraveineuse, intrapéritonéale, sous-cutanée, intradermique, intra-cardiaque), les administrations orales, les prélèvements sanguins, des gestes chirurgicaux et la formation au sacrifice et à la récupération d'organes selon le référentiel RITA, dans le cadre des études effectuées en routine dans l'entreprise, liées aux autorisations de projets d'Efficacité, Toxicité réglementaire, de modèles chirurgicaux, d'induction de polykystose rénale ou de cathétérisation jugulaire.

Un nombre minimum de gestes réussis a été défini pour valider les compétences du Personnel, en relation avec les obligations réglementaires (ANSM).

Les animaux recevant des injections ou des administrations orales de solution saline ou d'autres procédures de classe "légère" seront réutilisés pour valider plusieurs expérimentateurs, sous réserve du respect de l'absence de souffrance quelconque. Le geste technique est réalisée en prenant toutes les précautions permettant de limiter au maximum la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux. Une analgésie adaptée (Buprénorphine) est prévue lors de procédures douloureuses. Les traitements sont faits sous anesthésie générale gazeuse (Isoflurane) si nécessaire. Les conditions d'hébergement et d'élevage respectent la législation et visent à réduire au minimum le stress des animaux. Ils sont hébergés conformément aux spécificités de leur espèce (en groupe en général, sauf si une procédure nécessite un isolement temporaire, s'il y a une chirurgie, par exemple). Ils bénéficient d'un enrichissement de leur milieu (nid, bâtonnet à ronger, plateforme, etc).

Ces gestes ne peuvent pas être remplacés par des tests *in vitro* et sont impératifs à maîtriser par le personnel technique afin mener à bien et dans de bonnes conditions éthiques les tests principaux d'efficacité et de toxicité réglementaire réalisés en routine dans l'entreprise.

10 cobayes, 10 hamsters, 10 lapins, 150 rats, 300 souris seront utilisés sur 5 ans.

15099 Ce projet concerne le développement non-clinique réglementaire de produits pharmaceutiques et agro-alimentaires selon les référentiels de l'OCDE, ICH, EMEA et de la Pharmacopée Européenne. Une demande d'autorisation de projet similaire a été déposée en juin 2014 et ce projet avait été autorisé jusqu'en juillet 2019.

Il concerne des procédures réalisées en routine dans l'entreprise, étudiant les effets toxiques d'éléments d'essai

- Etudes de Contaminants viraux de thérapies cellulaires chez le cobaye et la souris pour évaluer la présence éventuelle de contaminants viraux dans des préparations cellulaires à visée de thérapie cellulaires humaines, selon les référentiels réglementaires de la Pharmacopée Européenne
- Etudes de Biodistribution pour évaluer la distribution d'un produit, dans les organes de l'animal, après son administration. Les animaux sont sacrifiés à un temps défini après la dernière administration, les organes sont collectés pour analyser la présence du produit et de ses métabolites.
- Etudes d'Immunogénicité pour évaluer la capacité à créer une réaction immunitaire après administration unique ou répétée d'un produit, suite à administration par voie sous-cutanée, intradermique, intra-musculaire, orale ou sublinguale, selon les référentiels réglementaires, chez le rat, la souris ou le lapin.
- Etude de sensibilisation pour évaluer l'irritabilité oculaire ou cutanée chez le cobaye et le lapin; l'irritation de muqueuses chez le hamster; la sensibilisation après l'administration d'un produit.
- Etudes de toxicité aigüe chez le rat et la souris.
- Etudes de toxicocinétique chez le rat et la souris pour évaluer la cinétique d'un produit après une administration.
- Etudes de toxicité sub-chronique (jusqu'à 3 mois) et chronique pour évaluer la toxicité après administration répétée d'un produit selon les référentiels réglementaires chez le rat, la souris et le lapin.

Etudes de toxicité chronique de 6 mois chez le rat.

- Etude de reprotoxicité chez le rat et la souris pour évaluer la toxicité d'un produit après administration à long terme (jusqu'à trois mois) sur les parents, et les générations suivantes.
- Etude de cancérogenèse chez le rat et la souris pour évaluer la capacité d'un produit à induire l'apparition de cellules cancéreuses, après administration tout au long de la vie de l'animal, selon les référentiels réglementaires.
- Etudes d'irritation vaginale chez le Lapin

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

Les conditions d'hébergement et d'élevage respectent la législation et visent à réduire au minimum le stress des animaux. Ils sont hébergés conformément aux spécificités de leur espèce (en groupe sauf si une procédure nécessite un isolement temporaire). Ils bénéficient d'un enrichissement de leur milieu (nid, bâtonnet à ronger, plateforme, etc). Une analgésie adaptée (Buprénorphine) est prévue lors de procédures douloureuses. Des traitements sont faits sous anesthésie générale gazeuse (Isoflurane) si nécessaire.

Nous prévoyons que 996 Cobayes, 60 Hamsters, 775 Lapins, 5400 Rats et 10200 Souris seront utilisés en 5 ans pour ce projet.

15100 Ce projet concerne les preuves de concept d'activités thérapeutiques de nouvelles molécules avec des efficacités anticancéreuses, antibiotiques, antidiabétiques, anti-inflammatoires, anti-ischémiques, protectrices de l'audition, biocides et anti-Alzheimer. Il inclut également les études de pharmacocinétique réalisées préalablement à ces études d'efficacité.

Une demande d'autorisation de projet similaire a été déposée en juin 2014 et ce projet avait été autorisé jusqu'en juillet 2019. Il concerne des procédures réalisées en routine dans l'entreprise.

Sur 5 ans, nous prévoyons d'utiliser 2750 rats et 8300 souris dans ce projet.

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

Les conditions d'hébergement et d'élevage respectent la législation et visent à réduire au minimum le stress des animaux. Ils sont hébergés conformément aux spécificités de leur espèce (en groupe sauf si une procédure nécessite un isolement temporaire). Ils bénéficient d'un enrichissement de leur milieu (nid, bâtonnet à ronger, etc). Une analgésie adaptée (Buprénorphine) est prévue lors de procédures douloureuses. Des traitements sont faits sous anesthésie générale gazeuse (Isoflurane) si nécessaire.

15101 Chaque année en France, 55 000 cancers du sein sont diagnostiqués, dont 15 à 20% sont dit triple négatifs et concernent en majorité des femmes jeunes. La chimiothérapie est la seule thérapie proposée en addition de la chirurgie puisque les cancers du sein triple négatifs sont insensibles à l'hormonothérapie du fait de l'absence d'expression des récepteurs hormonaux habituellement présents à la surface des cellules tumorales mammaires. Cependant environ deux tiers des tumeurs résistent au traitement de chimiothérapie et présentent un fort taux de rechute. Il est donc nécessaire de trouver de nouveaux marqueurs des cellules tumorales triple négatives afin de développer des anticorps spécifiques capables d'induire l'activation du système immunitaire et la destruction des cellules malignes. De façon intéressante, nous avons mis en évidence l'expression forte d'une forme particulière de CD160 à la surface des cellules de tumeurs mammaires triple négatives. Cette expression offre la possibilité de cibler CD160 dans ces tumeurs agressives par immunothérapie. Nos données réalisées *in vitro* montrent que l'ajout d'anticorps spécifiques dirigés contre cette molécule entraîne la destruction des cellules qui l'expriment, de façon dépendante des macrophages et des cellules tueuses naturelles (NK). Ces résultats laissent penser que cette forme de CD160 pourrait effectivement représenter une nouvelle cible thérapeutique majeure dans le traitement des cancers du sein triple négatifs. Il est à présent nécessaire de vérifier l'efficacité de ces anticorps comme thérapie anti-tumorale dans des systèmes *in vivo*.

Notre schéma expérimental consistera à faire pousser différents types de tumeurs humaines exprimant ou non le CD160 en inoculant des souris par voie sous-cutanée. Lorsque les tumeurs atteindront une taille de 100mm³, les souris seront ensuite traitées par des anticorps spécifiques de cette forme de CD160 ou par des anticorps contrôles, par voie intrapéritonéale. L'évolution, la stabilisation ou la régression de la taille des tumeurs sera suivie deux fois par semaine. Les souris seront mises à mort et les tumeurs seront prélevées pour des analyses ultérieures. Ces expériences permettront de tester *in vivo* l'efficacité d'un traitement ciblant cette forme particulière de CD160 et de comprendre les mécanismes d'action de l'isoforme CD160 dans un système physiologique intégré.

Ce projet, prévu sur 3 ans nécessitera 150 souris. La procédure expérimentale a été consciencieusement pensée et élaborée afin d'utiliser le moins d'animaux possible tout en permettant d'obtenir des résultats statistiquement satisfaisants. Des études préalables *in vitro* ont permis de sélectionner les anticorps les plus efficaces, ce qui permet de limiter le nombre d'animaux utilisés. Aucun remplacement n'est envisageable puisqu'il s'agit d'étudier la réponse immunitaire. La souffrance des animaux ne devrait pas dépasser un niveau de contrainte équivalent à l'introduction d'une aiguille selon les bonnes pratiques vétérinaires. Cependant, une grille d'évaluation de la douleur adaptée à ce projet a été élaborée pour surveiller l'état général de l'animal, son apparence, son comportement, révélateurs du niveau de douleur. En cas d'atteinte de points limites, la mise à mort de l'animal sera anticipée.

15102 Les infarctus cérébraux, aussi connus sous le nom d'AVC pour accident vasculaire cérébraux, sont une cause majeure de handicap à long terme. Il est bien établi que le volume de l'infarctus cérébral

ne prédit qu'imparfaitement les séquelles ce qui laisse penser que des altérations peuvent aussi survenir à distance de l'AVC.

Une étude en Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) réalisée sur plus de 400 patients victimes d'un AVC indique que du fer s'accumule dans des régions, initialement épargnées par l'infarctus, comme le thalamus. Nos données suggèrent fortement que l'excès de fer dans ces régions, qui apparaît dans les suites de l'AVC, a un impact péjoratif sur l'évolution clinique à long terme. Autrement dit, plus l'accumulation de fer dans le thalamus est importante dans les suites d'un AVC et plus la récupération risque d'être mauvaise.

Nous faisons l'hypothèse qu'éviter l'accumulation de fer par des traitements chélateur du fer pourrait protéger les régions déconnectées par l'AVC et ainsi avoir un impact neuro-protecteur.

Avant d'envisager un essai thérapeutique chez l'homme, il convient de prouver chez l'animal que du fer s'accumule progressivement dans les régions déconnectées par l'AVC et que celui-ci induit des dommages cellulaires. Il convient également de mesurer les effets possibles du traitement chélateur. Ce projet vise donc à quantifier le fer par IRM sur un modèle murin d'infarctus. L'IRM est une méthode d'imagerie de choix car elle n'est pas invasive, et permet donc des examens répétés.

Pour réaliser cette étude, 160 souris C57BL/6J seront utilisées. L'AVC sera induit par la méthode photo-thrombose qui est actuellement la méthode la moins invasive pour reproduire la pathologie humaine. Comme un suivi des animaux est nécessaire, il n'y a pas de méthode alternative permettant de les remplacer. Nous avons réduit à 160 le nombre d'animaux que nous prévoyons d'utiliser. Il s'agit du nombre minimal d'animaux nécessaire à l'obtention de données de qualité exploitable et permettant une analyse statistique fiable. Un premier lot de 16 animaux sera utilisé pour la mise au point des méthodes IRM.

En effet, quantifier le fer, en faible concentration, nécessitera de développer une méthode IRM spécifique. Ensuite, 3 groupes supplémentaires de 48 animaux seront utilisés. Le premier groupe visera à suivre l'évolution de la concentration en fer mesurée en IRM à 2 semaines, 4 semaines et 7 semaines après l'induction du modèle d'AVC (groupe photothrombose) par comparaison à un groupe contrôle sans AVC. A chaque point temporel, six animaux par groupe seront sacrifiés pour des analyses histologiques et pour vérifier les mesures de fer grâce à une méthode dite de référence appelée spectroscopie de masse. Nous testerons ensuite les effets d'un chélateur du fer commercial en reconduisant les mêmes mesures sur un groupe recevant le traitement de façon quotidienne à partir de J2 et un groupe recevant le placebo. Les animaux seront hébergés dans des conditions d'hébergement favorisant leur bien-être (enrichissement, nourriture et eau à volonté). Des points limites ont été établis afin d'anticiper toute souffrance et réduire au mieux l'inconfort des animaux.

15103 Les lésions cranio-faciales et leur traitement constituent un enjeu de santé publique important. Les approches thérapeutiques sont bien plus complexes au niveau de la face que pour un bras ou une jambe cassée pour un souci d'approche chirurgicale mais également au niveau des mécanismes impliqués. En effet les os de la face se réparent par des mécanismes de remodelage différents de ceux des os longs. Lorsque des avancées thérapeutiques sont prometteuses pour la réparation des os longs, il est important d'évaluer si ce traitement peut être transposé à la sphère cranio-faciale.

La sclérostine, une protéine exprimée dans l'os, est un régulateur négatif du remodelage osseux. Cette protéine est au centre d'un traitement novateur pour limiter la destruction osseuse dans le cadre de l'ostéoporose post-ménopause chez la femme. L'inhibition de la sclérostine a également été proposée pour accélérer la réparation de fractures des os longs. Suite à de nombreux travaux de recherche précliniques et cliniques, un anticorps anti-sclérostine est aujourd'hui utilisé en clinique pour inhiber l'effet de cette protéine et favoriser la formation osseuse. Notre projet déterminera si l'inhibition de l'expression de sclérostine peut également favoriser la réparation d'une lésion osseuse sévère des os de la face.

Pour évaluer cette hypothèse, nous utiliserons le modèle bien établi chez la souris du défaut osseux de taille critique de l'os pariétal du crâne (craniotomie). La lésion sera comblée par un support constitué d'une matrice de collagène dense contenant des cellules pulpaire murines. Nous

évaluerons grâce à l'imagerie micro-scanner si 1) les souris invalidées pour le gène de la sclérostine présentent après lésion, un remodelage osseux plus rapide et de meilleure qualité que les souris sauvages 2) des souris sauvages lésées et traitées par des matrices contenant des cellules pulpaire issues de souris sclérostine KO permettent un remodelage plus rapide et de meilleure qualité que les matrices contenant des cellules pulpaire de souris sauvages. Si ces deux points sont validés, nous évaluerons si 3) l'administration d'un anticorps anti-sclérostine, permet de potentialiser la réparation du tissu lésé.

Durant le temps des expériences, les souris seront suivies quotidiennement et des mesures seront prises afin de réduire la douleur si elle est détectée. Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisés sera réduit au nombre minimum nécessaire et suffisant pour permettre l'analyse statistique des données. Au total, 100 souris seront utilisées dans ce projet. Afin de respecter au mieux les principes de l'éthique, nous atténuerons ou supprimerons la douleur, la souffrance et l'anxiété en ayant recours à une anesthésie générale pour la chirurgie ainsi qu'à un traitement antidouleur en post-opératoire. De plus, nous utiliserons pour nos analyses une méthode d'imagerie par Micro-scanner non invasive qui permet d'obtenir un volume en 3D de la reconstruction osseuse tout au long de l'expérience de chaque individu. Pour ce projet, il n'existe pas de méthode substitutive au modèle animal car les approches *in vitro* ou *in silico* ne permettent pas l'étude de l'ensemble des interactions physiologiques impliquées dans le processus de réparation osseuse, en particulier dans le cas d'un traitement systémique. La greffe de cellules pulpaire pour la réparation de trauma osseux semble prometteur, il est important d'évaluer si ces greffes peuvent être potentialisées avec des traitements existants afin de limiter les échecs en clinique.

15104 Les matières grasses alimentaires servent à satisfaire non seulement une partie de nos dépenses énergétiques mais également nos besoins en acides gras essentiels (AGE). Il existe deux familles d'AGE, respectivement nommés oméga3 et oméga6. Il est aujourd'hui bien admis que les matières grasses alimentaires influencent la santé de l'Homme et jouent un rôle dans l'apparition d'un grand nombre de pathologies comme l'obésité. Ainsi, la littérature montre qu'une consommation excessive d'oméga6 aurait des effets plutôt négatifs pour la santé comparée à celle d'oméga3 qui aurait des effets plutôt bénéfiques. Les souris génétiquement modifiées (*fat-1*), dont les tissus sont riches en oméga 3, ne développent pas (comme nous l'avons récemment montré) d'obésité lorsqu'on leur donne un régime riche en matières grasses. Par ailleurs, de plus en plus d'études montrent que le microbiote, ensemble des microorganismes du tube digestif, est lui aussi impliqué dans l'obésité.

Afin de déterminer si cette capacité à résister au développement de l'obésité peut être transmise via le microbiote, notre projet consiste à transférer le microbiote de ces souris *fat-1* à des souris conventionnelles C57Bl/6 nourries avec un régime riche en matières grasses, les empêchant ainsi de devenir obèses. Cet objectif ne peut être atteint que par le recours à l'expérimentation animale rendant impossible son remplacement.

Pour ce projet, nous aurons besoin de 128 souris. En effet, nous aurons 4 groupes de 8 souris C57Bl/6, pour moitié nourries durant 14 semaines avec un régime contrôle ou riche en matières grasses, qui recevront toutes du microbiote intestinal à 8 reprises (de souris C57Bl/6 ou de souris *fat-1*). Sachant que, en fonction du volume de leur contenu caecal, le microbiote prélevé sur 6 souris peut être transféré à 16 souris, il nous faudra donc 96 souris donneuses. Une étude statistique préalable a permis de réduire au plus juste le nombre d'animaux nécessaires au regard de nos objectifs (réduction). Cette expérimentation nécessite de placer les souris en cage individuelle. Chaque cage sera enrichie par ajout de sopalin pour nicher et d'un tunnel pour se cacher (raffinement).

Durant les 14 semaines d'expérimentation nutritionnelle, 1) nous pèserons hebdomadairement les souris et une étude de prise alimentaire sera effectuée, 2) nous collecterons des fèces (défécation naturelle), 3) nous réaliserons 3 tests de perméabilité intestinale : un produit inerte sera administré par gavage et nous collecterons du sang au niveau submandibulaire 4 heures plus tard pour le doser, 4) nous procéderons à 2 tests de tolérance au glucose (mesure du glucose sanguin suite à l'administration par gavage d'une solution de glucose), 5) ainsi qu'à 2 tests de tolérance à l'insuline (mesure du glucose sanguin suite à l'injection abdominale d'insuline).

Les gavages (microbiote, glucose), les injections (insuline) et les prélèvements sanguins, seront réalisés par une personne formée et compétente réalisant ce geste depuis des années. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience. Cela nous permettra d'intervenir rapidement et de façon appropriée si un problème survenait.

15105 Les maladies d'Alzheimer et apparentées (MAA) sont des maladies neurodégénératives associées au vieillissement. Leur prévention constitue un enjeu essentiel en raison de l'importance du problème de santé publique qu'elles constituent et de l'absence de traitement efficace à l'heure actuelle. Le vieillissement s'accompagne de dysfonctionnements métaboliques tels que la survenue de dérivés résultant de l'utilisation de l'oxygène et une subinflammation chronique. Des déséquilibres alimentaires favoriseraient ces phénomènes associés au vieillissement en modifiant les populations de bactéries intestinales et les flux de composés alimentaires passant de l'intestin au reste de l'organisme. Ces dysfonctionnements métaboliques fragiliseraient le cerveau, organe particulièrement sensible en raison de l'activité de son métabolisme et de la faiblesse des mécanismes protecteurs. Cette fragilisation cérébrale augmenterait le risque de survenue des MAA. Les organismes probiotiques, comme les bactéries lactiques présentes déjà dans l'alimentation de l'homme du néolithique, pourraient compenser les effets négatifs des déséquilibres alimentaires sur les bactéries intestinales et les troubles induits et transmis au cerveau. La présente étude a pour but d'évaluer, chez la souris, les capacités de trois souches de bactéries probiotiques appartenant à des espèces utilisées dans l'industrie laitière à combattre les dysfonctionnements associés aux MAA. Ces derniers seront reproduits chez la souris par deux types d'apports 1- un régime modérément hyperlipidique et riche en acides gras de la série ω -6, 2- un apport en galactose. Les acides gras poly-insaturés de la série ω -6, beaucoup retrouvés dans l'huile de consommation courante comme le tournesol et dans les graisses animales sont consommés en France en excès de 7 à 10 fois par rapport à leurs homologues ω -3, présentes dans certaines huiles réservées à la consommation crue dans les salades. Ce rapport ω -6/ ω -3 est supérieur aux recommandations des agences de nutrition européennes qui préconisent un rapport ω -6/ ω -3 inférieur à 5. Certains travaux scientifiques avancent que cet excès d' ω -6 pourrait induire une inflammation chronique. En particulier, l'acide arachidonique (ARA), le plus long acide gras ω -6, apporté par la consommation de produits d'origine animale, est converti en composés impliqués dans l'inflammation. Des études ont indiqué qu'un régime riche en ARA sensibilise les souris aux agents de la maladie d'Alzheimer. D'autres travaux ont montré que l'ARA favorise les espèces bactériennes pro-inflammatoires dans l'intestin et ainsi l'obésité et l'inflammation chez des souris mâles nourries par un régime hyperlipidique. Le lactose, le sucre du lait est constitué de galactose et de glucose. De nombreux travaux scientifiques ont montré qu'une administration de galactose en sous cutanée, intrapéritonéale ou par l'eau de boisson pendant 6 à 8 semaines, provoque un vieillissement accéléré des souris ou des rats et une accumulation intracérébrale d'agents de la maladie d'Alzheimer. Des apports excessifs de ce sucre simple, très proche chimiquement du glucose, dépasseraient les capacités des voies métaboliques, provoquerait une déplétion de certaines molécules importantes pour l'équilibre entre oxydation et réduction induisant ainsi un excès de molécules dérivés de l'utilisation de l'oxygène. L'étude, d'une durée de 9 semaines aura pour but d'évaluer les capacités de probiotiques à réduire/limiter ou combattre les dysfonctionnements associés aux MAA. Pour se faire, 8 lots de 25 animaux seront constitués soit 200 souris mâles Balb/C au total sur 5 ans. Trois conditions seront testées dans chacun de ces lots régime alimentaire standard ou riche en ARA (P1), apport ou non de galactose (P2), apport ou non de probiotiques (P3). Chacun des deux régimes alimentaires sera testé seul ou en association avec l'apport de galactose et/ou de probiotiques. Les animaux seront exposés au galactose et aux probiotiques tout au long de l'étude. Les fèces seront prélevées à intervalle régulière, les capacités de mémoire et le niveau d'anxiété des animaux seront évaluées à l'aide de 4 tests comportementaux (P4-7). A la fin de l'étude, les animaux seront mis à mort et des prélèvements de cerveau, de tissus intestinaux, de tissus adipeux et hépatiques seront effectués pour rechercher une inflammation, une surcharge lipidique, une atteinte des synapses et de les barrières intestinale (P8) et hématoencéphalique (P9-10). Les souris seront nourries ad libitum et maintenues dans des cages contenant de l'enrichissement environnemental. En cas de comportement anormal (arrêt de la prise alimentaire

ou hydrique, perte de poids excessive, vocalise, piloerection, prostration, baisse de motricité ou de réactivité, respiration excessive, absence de toilettage), les animaux seront exclus de l'étude et mis à mort en conformité avec les recommandations éthiques. Le nombre d'animaux est fixé à minima en tenant compte des différents types d'analyses, de l'exploitation statistique des données comportementales, de la validité et de l'interprétation scientifique des résultats (réduction). Les expérimentations seront effectuées selon la réglementation et les recommandations en vigueur en termes de bien-être et de limitation de l'inconfort et de la douleur (raffinement) de manière à garantir la qualité des résultats. Ce travail nécessite le recours à l'animal entier, seul niveau d'organisation permettant d'évaluer les effets négatifs des régimes alimentaires sur le microbiote intestinal et le retentissement sur les fonctions cérébrales ainsi que les effets positifs des probiotiques, il ne peut être substitué par des méthodes alternatives (remplacement). En terme de conséquence pour l'homme, ce projet permettra de déterminer si des souches probiotiques sont capables chez la souris de diminuer les perturbations de grandes fonctions de l'organisme associées aux MAA et induites par les apports alimentaires. Une réponse positive permettra d'appuyer le concept que les bactéries intestinales jouent un rôle important dans la survenue de ces maladies liées au vieillissement chez l'humain et que des corrections sont possibles pour retarder la survenue de ces pathologies. Ce projet a été validé par le conseil scientifique du laboratoire.

15106 La fragmentation des habitats induite par l'anthropisation des terres, en particulier avec la construction d'infrastructures linéaires de transports dont les routes, est l'une des causes majeures reconnues de l'érosion de la biodiversité. Afin de rétablir les connexions entre les habitats séparés par ces infrastructures, des passages à faune sont installés en association avec des clôtures pour réduire la mortalité due à la circulation routière. Ces clôtures servent également de guide jusqu'aux passages à faune. La construction des routes à grandes vitesses est par ailleurs systématiquement associée à la mise en place de bassins d'orage captant les eaux de ruissellement afin de les contenir, les stocker et les dépolluer avant leur évacuation dans l'environnement. Bien que l'eau des bassins d'orage est logiquement polluée, il a été montré à plusieurs reprises que ces bassins peuvent être colonisés par la flore et la faune et notamment par les amphibiens. Ce taxon est l'un des plus menacés au niveau mondial et la totalité des espèces présentes sur le territoire français est protégée. Actuellement ces bassins, étant donné les risques liés à leur pollution, sont cloisonnés afin d'éviter leur colonisation par la faune aquatique. Cependant une étude récente menée sur un grand nombre de bassins et de dispositifs de cloisonnement a montré que ces dernières sont inefficaces. Parmi elles se trouvent les grillages petites-faune installées communément le long des voies. Aujourd'hui, les collectivités territoriales diligentent des études visant à trouver des solutions alternatives pérennes et efficaces pour empêcher les amphibiens d'accéder à ces bassins d'orage ou traverser les voies. Le but du présent projet est de tester en conditions contrôlées différents types de clôtures sur les espèces d'amphibiens (anoures et urodèles) les plus sensibles et/ou les plus à même de franchir les mesures de cloisonnement actuelles.

Cette étude se focalise sur une espèce d'amphibien très sensible le Crapaud vert (*Bufo viridis*), espèce présente en forte concentration dans les bassins d'orage existants et au voisinage immédiat d'une nouvelle voie en construction. Une seconde espèce à l'écologie similaire et dont le statut de protection est un peu moins préoccupant pourrait servir d'espèce de substitution (=Remplacer) le Crapaud calamite (*Epidalea calamita*). Par ailleurs, nous souhaitons compléter notre étude avec trois espèces particulièrement « agiles » au franchissement d'obstacles la Grenouille agile (*Rana dalmatina*), susceptible de franchir ces structures verticales plus facilement que les crapauds (par saltation), le Triton palmé (*Lissotriton helveticus*) et la Rainette verte (*Hyla arborea*) qui eux sont susceptibles de les escalader (i.e. par adhérence). Pour les trois espèces d'Anoures où le dimorphisme sexuel est marqué (e.g. taille, motivation...), les deux sexes seront testés séparément (n=10 par espèce et par sexe). Les deux sexes seront confondus pour le triton palmé (n=20). Enfin, des juvéniles sont également susceptibles d'escalader ces structures (par adhérence) lors de leur phase de dispersion et donc de traverser les voies nous utiliserons n= 20 juvéniles par espèce. Nous utiliserons au total 160 individus des trois espèces (Crapaud vert ou calamite, grenouille agile, triton palmé et rainette verte). Tous ces groupes ne pouvant être testés lors de la première saison de reproduction (2019), nous nous donnons la possibilité de reporter certains de ces groupes sur

une période de trois ans. Chaque individu adulte sera identifié par l'implantation d'une puce sous-cutanée (RFID) après anesthésie locale, puis relâchée sur le lieu exact de capture immédiatement après l'expérimentation proprement dite (d'une durée maximale de 15 jours par groupe). Ce marquage systématique permet d'éviter de réutiliser les mêmes individus l'année suivante. Mis à part le cas du crapaud vert versus le crapaud calamite, cette étude ne peut être réalisée sur d'autres espèces il n'est pas possible, pour tester ces dispositifs de protection, de remplacer ces espèces modèles (Remplacement). Toutefois, l'effectif des individus testés par espèce est réduit à son minimum pour avoir une puissance de test statistique satisfaisante tout en réduisant le nombre d'animaux impliqués dans l'expérience. De plus, des alternatives de raffinement ont été mises en place (manipulation courte limitant le stress, phase d'acclimatation post-test, mesures de prophylaxie) afin d'améliorer le bien-être et la santé des animaux utilisés dans le cadre de cette expérimentation.

15107 L'obésité représente un problème de santé publique croissant dans notre société. L'étude des mécanismes biologiques à la base de la régulation de la prise alimentaire devrait nous permettre de mieux prendre en charge cette maladie. Il s'agit d'identifier de nouvelles cibles d'intérêt thérapeutique ou d'établir de nouvelles recommandations nutritionnelles. Nos études sur le fonctionnement cérébral visent à déterminer comment sont perçus et intégrés les différents signaux nutritionnels et sensoriels impliqués dans la régulation de la prise alimentaire. Une mauvaise perception de ces signaux au niveau des aires cérébrales contrôlant l'appétit semble être un facteur à risque d'obésité. Le système neuronal à mélanocortine est un des circuits neuronaux gouvernant la prise alimentaire les mieux caractérisés. L'objectif du projet est d'étudier l'activité de ce système neuronal en fonction de l'état prandial. Nous évaluerons chez la souris comment des signaux physiologiques postprandiaux libérés par le tractus gastrodigestif influencent l'activité de neurones impliqués dans le contrôle de la satiété.

Le projet nécessite l'utilisation de modèles expérimentaux vivants. En effet, il n'existe pas actuellement de méthodes ou de modèles de substitution permettant d'étudier le comportement alimentaire et de la satiété en particulier, en fonction de paramètres physiologiques tels que la glycémie, le poids, l'adiposité, ou l'état hormonal. Ces paramètres mettent en jeu des dialogues entre organes qui ne sont pas modélisables *in vitro* ou *in silico*. Ainsi le projet sera réalisé chez la souris (*mus musculus*), modèle de référence pour les études métaboliques, du fait de nombreuses similarités entre son métabolisme et celui de l'Homme. Nos études antérieures nous ont permis de valider le modèle expérimental qui sera utilisé dans ce projet et de déterminer le nombre d'animaux nécessaires et suffisants pour mener ce projet.

Cette étude nécessitera 120 animaux pendant 5 ans. Un suivi quotidien sera fait pour s'assurer du bien-être des animaux, tandis que les prises de mesures hebdomadaires (poids, prise alimentaire) seront effectuées. L'ensemble des procédures utilisées pour générer le modèle et pour les prises de mesure ont été optimisées et standardisées.

De plus, tous les animaux qui seront utilisés dans ce projet seront élevés dans un environnement enrichi permettant l'expression de comportements innés et favorisant le soin maternel et la protection des animaux. Ce raffinement contribue au bien-être animal, ce qui réduit la variabilité inter-individuelle engendrée par le stress, et par conséquent limite le nombre d'individus nécessaires pour les études statistiques.

15108 Le bar commun (*Dicentrarchus labrax*) est l'une des principales espèces de poissons marins d'intérêt aquacole en Europe. Un virus a été récemment isolé en cultures cellulaires à partir de larves de bars issues de lots présentant un taux de mortalité anormalement élevé. L'expression clinique semble limitée à une fenêtre de développement précise (entre 20 et 35 jours post-éclosion), et probablement associée à des cofacteurs qui restent à définir. Le virus, présent à une forte prévalence au sein de l'élevage touché, n'a pas pu être identifié avec les outils disponibles ciblant les principaux virus pathogènes connus des poissons. Différentes approches ont été utilisées pour le caractériser (séquençage complet, microscopie électronique,) et ont permis de suspecter un genre viral particulier jamais décrit jusqu'alors chez cette espèce. Le risque commercial pour les

pisciculteurs, notamment les écloseries, peut être très important avec des pertes économiques conséquentes lors de la phase d'expression clinique de la maladie, l'évolution de l'infection et la diffusion potentielle du virus après résolution des symptômes étant actuellement inconnues.

Les objectifs de ce projet consistent 1) à confirmer le caractère pathogène de ce virus sur larves de bars, 2) à étudier les organes cibles privilégiés sur des stades juvéniles et 3) à optimiser un test de détection d'anticorps spécifiques du virus qui permettra de réaliser des suivis de statuts sanitaires d'élevages potentiellement touchés.

Un total de 10000 larves de bar sera utilisé pour vérifier le caractère pathogène du virus. Après quelques jours à 18°C, les larves seront contaminées par bain dans une eau contenant le virus produit en culture cellulaire. Un suivi quotidien de la mortalité sera assuré. Des prélèvements seront réalisés à divers temps après infection pour évaluer l'évolution de la charge virale.

Pour l'étude de la diffusion du virus dans les animaux, 100 juvéniles seront infectés par injection intrapéritonéale de surnageant de culture virale et maintenus dans une eau à 18°C. Des prélèvements d'organes seront réalisés sur des groupes de 5 poissons à différents temps après infection afin d'évaluer l'évolution de la charge virale en fonction des organes prélevés.

Enfin, un total de 21 bars adultes sera utilisé pour développer et valider le test de détection d'anticorps spécifiques. Les poissons seront répartis en 3 lots un lot témoin, un lot infecté avec du surnageant de broyat de larves positif, et un lot infecté avec du surnageant de culture cellulaire positif, par voie intrapéritonéale. Des prélèvements non invasifs (prélèvements de sang) seront réalisés 30, 60, et 90 jours après infection à 18°C afin d'étudier la mise en place d'une éventuelle réponse immunitaire spécifique.

Les procédures seront menées dans le respect de la règle des 3R, à savoir, tout d'abord, la réduction du nombre d'animaux utilisés au seuil de la pertinence scientifique et statistique et le raffinement des conditions d'hébergement. Le nombre important de larves s'explique par des taux de mortalité à ce stade relativement élevés. Les mesures de raffinement viseront à assurer des conditions optimales d'hébergement des animaux (volume d'eau adapté, oxygénation suffisante, maintien à l'obscurité pour les larves et alimentation spécifique (*Artemia*), rythme jour/nuit naturel pour les stades juvéniles et adultes, présence de suffisamment de congénères pour exprimer un répertoire comportemental riche). Le remplacement n'est pas envisageable, l'utilisation du bar étant incontournable s'agissant de la seule espèce-cible décrite à ce jour pour ce virus.

15109 Les protocoles décrits visent à étudier les mécanismes par lesquels les récepteurs cérébraux de la caféine sont impliqués dans la régulation de la fonction du système nerveux dans des conditions physiologiques et pathologiques. Ce projet vise notamment à mieux comprendre l'impact de la caféine sur la cognition et la neurodégénérescence. Ces études font appel à des modèles qui d'une part permet de modifier le récepteur de la caféine dans différentes cellules et structures du système nerveux et qui seront combinés à des modèles reproduisant les différentes lésions/anomalies retrouvées dans le cerveau des patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Les modèles sont générés par différentes approches transgéniques et virales. Ces expériences ont finalement pour but de mieux comprendre comment ces récepteurs de la caféine contrôlent la cognition et la dégénérescence neuronale, d'en extraire des voies de modulation potentielles et in fine de trouver de nouvelles approches thérapeutiques. Ces expériences en voulant corréler approches moléculaires et cognition doivent se faire dans des modèles appropriés *in vivo*. La règle des 3Rs a été prise en compte dans l'élaboration du présent protocole 1) Raffinement dans tous les protocoles, l'ensemble des procédures expérimentales sera réalisé en limitant au maximum (durée et intensité) toute douleur et/ou stress pour les animaux utilisés par la mise en place de période d'accoutumance et l'emploi d'anesthésiants et antalgiques adaptés. Les animaux seront hébergés avec un enrichissement du milieu. L'évaluation de la souffrance sera basée sur un suivi quotidien (attitude corporelle, aspect du pelage, poids corporel) de sorte à administrer un traitement antiinflammatoire/antalgique supplémentaire, ou sortir un animal de l'étude en cas d'atteinte des points limites établis. 2) Réduction Pour chacun des groupes constitués, le nombre d'animaux a été réduit au maximum tout en permettant l'obtention de résultats satisfaisant (différences statistiquement observables). 3) Remplacement L'objectif de ce projet est d'évaluer différents

aspects de la cognition. L'utilisation d'animaux vivants revêt donc un caractère de stricte nécessité. Le nombre total d'animaux concernant les procédures de notre unité sur les 5 ans à venir est estimé à 7800 (souris). Cette utilisation maximise les données obtenues de chaque animal, ce qui peut limiter ou éviter l'utilisation subséquente d'animaux supplémentaires, et ce, sans pour autant compromettre le bien-être animal. Les animaux seront suivis précisément pour chaque protocole, pour lesquels des points limites adaptés ont été définis. Toute souffrance, angoisse ou comportement inhabituel sera pris en charge par des approches appropriées. Les animaux présentant un des points limite spécifié pour chaque approche expérimentale sera sacrifié dans une salle dédiée le tout en lien avec le responsable du bien-être animal.

15110 Il existe un risque non négligeable (environ 50%) de développement de bactéries dans l'urine et d'infection urinaire chez les patients équipés de sonde urinaire sur des périodes prolongées (>48h). Dans le but de diminuer la fréquence et /ou l'importance de ces infections urinaires, des sondes enduites de produits ou molécules aux propriétés antiseptiques ou antimicrobiennes peuvent être utilisées.

Avant de commercialiser ce type de sonde, il est cependant nécessaire de montrer leur efficacité. Avant de tester ce type de sonde chez le patient (étude clinique), il est nécessaire de réaliser des études précliniques dites de preuve de concept chez l'animal et en particulier chez le porc qui est reconnu pour être un bon modèle expérimental de l'appareil urinaire.

Avant de pouvoir réaliser ces études de preuves de concept, des études pilotes ont été menées afin de définir la taille des sondes qui devront être utilisées ainsi que d'adapter à la truie la méthode de pose décrite chez la femme.

Après une période d'acclimatation, les animaux seront anesthésiés. La région vulvaire sera désinfectée et la sonde sera introduite. La position correcte de la sonde dans la vessie sera vérifiée par observation de l'écoulement d'urine via la sonde. Une suture de cette sonde sera réalisée à l'arrière de la cuisse afin d'éviter que la truie ne marche dessus.

La moitié des animaux seront équipés avec une sonde test et l'autre moitié avec une sonde déjà présente sur le marché (sonde de référence pour l'interprétation des résultats).

Les animaux seront hébergés en individuel afin d'éviter qu'un animal n'arrache la sonde de l'autre. De l'enrichissement adapté aux truies sera présent dans chaque box et les animaux auront la possibilité d'avoir des contacts auditifs, olfactifs et visuels.

La position des sondes et l'état de santé des animaux seront suivis quotidiennement. Des analyses de sang et d'urines seront effectuées à intervalles réguliers pour suivre l'état de santé des animaux (absence d'infection). Les animaux seront autopsiés au bout de 7, 14 ou 28 jours afin d'évaluer l'absence d'effet sur l'appareil urinaire (observation macroscopique et microscopique)

Nous prévoyons des groupes de 18 animaux par type de sonde (6 animaux/type de sonde /jour d'autopsie) ce qui permet de prendre en compte la variabilité interindividuelle des résultats soit 36 animaux par étude de preuve de concept auquel il faut rajouter une dizaine d'animaux en réserve en cas d'impossibilité de pose de la sonde (présence d'infection, sondage difficile) soit 45 animaux par étude. Nous prévoyons de réaliser au maximum 3 études de preuve de concept sur 5 ans et donc d'utiliser au maximum 135 animaux.

15111 L'embolisation artérielle est une intervention thérapeutique de radiologie interventionnelle, consistant à obstruer une artère en injectant un produit ou en utilisant un dispositif médical. Elle permet d'arrêter le flux sanguin qui constitue ou qui nourrit une lésion, ou de boucher une lésion portée par l'artère que l'on veut emboliser. La nature des lésions à emboliser est très variable il peut s'agir de malformations congénitales des vaisseaux, de lésions secondaires à un traumatisme ou des tumeurs bénignes ou malignes. L'embolisation est réalisée à l'aide de matériaux choisis selon la nature de la lésion petites particules solides (coils, plugs, microsphères), liquides qui se solidifient dans la lésion (colle), ou petits ressorts métalliques (stent).

La technique utilise un cathéter introduit au niveau de l'artère fémorale, qui va être dirigé sous rayons X vers l'artère à traiter par l'injection du matériau. Ce projet a pour but l'évaluation d'agents d'embolisations divers, leur utilisabilité ainsi que leur efficacité.

L'embolisation est une pratique courante en clinique permettant une alternative à la chirurgie qui est invasive, douloureuse et parfois non réalisable. Cette procédure permet une récupération beaucoup plus rapide pour les patients et une durée d'hospitalisation plus courte. Dans ce contexte, proposer aux praticiens des solutions diverses répondant à toutes les utilisations potentiellement éligibles à l'embolisation est un problème de santé publique. Seule l'expérimentation *in vivo*, mimant le plus fidèlement la vascularisation humaine permettra de répondre à ce défi par l'évaluation préclinique des nouveaux agents d'embolisations.

Le porc est le meilleur modèle animal pour l'étude de ces nouveaux agents, avec son réseau vasculaire permettant d'être proche des malformations artério-veineuses soignées par l'embolisation chez l'homme. Cet animal possède également une particularité anatomique, son réseau vasculaire permettant d'être proche des MAV (Malformation Artério-Veineuse) soignée par l'embolisation chez l'homme. Ce modèle animal permet également l'étude de plusieurs types d'agents d'embolisations utilisés pour diverses pathologies humaines (fibromes utérins, MAV).

Un premier tri des agents potentiellement intéressants est fait à partir des mesures physico-chimiques et des techniques *in vitro* (méthode de flux) pour ne sélectionner que les plus prometteurs. Ce projet nécessitera 72 animaux afin de vérifier l'efficacité et l'inocuité des produits choisis avant tout essai chez des patients humains ou animaux afin de les protéger d'effets adverses ou indésirables conformément aux règles internationales d'éthique biomédicale. Les groupes sont réduits à 6 animaux qui est le nombre minimal habituellement considéré comme nécessaire par les comités de protection des patients pour démontrer que le risque est faible.

L'expérimentation *in vivo* est réalisée par du personnel expérimenté. Pour éviter toute douleur, les embolisations se feront sous anesthésie générale avec des antalgiques pendant toute la durée de l'intervention. Dans toute la mesure du possible, les animaux seront hébergés en groupes et habitués à être manipulés. Des renforcements positifs leur seront distribués sous forme de récompenses alimentaires, notamment lorsqu'ils seront manipulés (injections ou prélèvements).

Enfin, des points-limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

A terme, les résultats de ce projet pourraient permettre d'identifier de nouveaux agents d'embolisation pour des besoins médicaux non encore satisfaits, et/ou d'améliorer les solutions mises actuellement à la disposition des praticiens.

15112 En décembre 2019 a été identifiée une nouvelle pathologie respiratoire très contagieuse dont l'agent infectieux a été identifié en janvier 2020. Il s'agit d'un nouveau coronavirus appelé SARS-CoV-2. Face à la menace de pandémie mondiale, il est urgent de développer et de tester des approches thérapeutiques et vaccinales.

Pour cela, des candidats vaccins sont d'ores et déjà en développement et en cours de tests *in vitro*. Toutefois, leur capacité à induire une réponse immunitaire ne peut être évaluée que dans des organismes entiers tels que des souris dont le système immunitaire est suffisamment proche de celui de l'homme.

Pour évaluer si les anticorps induits chez la souris par le vaccin sont capables de protéger contre une infection par le virus, un test *in vitro* permet de vérifier si les anticorps peuvent neutraliser le virus et l'empêcher d'infecter des cellules. Si ce test est positif, il est indispensable de le compléter par un test de protection chez un organisme entier qui est d'abord vacciné puis infecté. Ceci supposera que soit préalablement développé un modèle d'infection.

Ce projet sera conduit sur des souris car il existe déjà des données dans la littérature sur un coronavirus très proche, l'agent du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS), qui montrent la pertinence du modèle souris pour l'infection humaine. Ces données, qui nous aideront à aboutir rapidement à des résultats, indiquent que l'infection de la souris par un virus isolé chez l'homme induit une infection de gravité modérée avec surtout un retard de croissance ou une légère perte de poids et une baisse temporaire de l'état général de l'animal mais sans troubles respiratoires.

Quoiqu'il en soit, l'état de santé des animaux sera suivi chaque jour pour détecter des signes cliniques plus importants que prévu, et intervenir au plus tôt si nécessaire. Le projet utilisera au total 492 souris adultes (mâles ou femelles de 6 à 12 semaines) dans 3 procédures dont 240 dans une procédure de sévérité légère pour l'évaluation de l'immunogénicité des vaccins et 252 dans deux procédures de sévérité modérée pour la mise au point du modèle d'infection et les tests de protection vaccinale. Les effectifs des groupes ont été ajustés au meilleur de notre expérience et au regard d'autres travaux similaires déjà publiés. Dans la mesure du possible, les animaux seront leur propre témoin pour augmenter la puissance des expériences. Les moyennes des groupes seront comparées par une ANOVA. Les expériences ayant donné les meilleurs résultats seront répliquées afin de conforter la validité des conclusions.

Au total, ce projet permettra de mettre au point un modèle d'infection par le SARS-CoV-2 qui menace la population mondiale, et de tester l'efficacité de candidats vaccins. Les résultats seront partagés avec la communauté scientifique pour accélérer la découverte de moyens de lutte efficaces.

15113 La flore intestinale s'installe au niveau des muqueuses intestinales dès la naissance. Un équilibre s'installe assez rapidement entre ces micro-organismes et le système de défense immunitaire afin d'assurer l'homéostasie intestinale.

La synthèse de la littérature actuelle met en évidence que la flore digestive d'un sujet sain est stable au cours du temps et qu'elle est capable de moduler le système immunitaire. En revanche, ses altérations peuvent être associées aux traitements médicamenteux ou à certains états pathologiques (maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, diabète de type 2). La flore fongique représente moins de 1% des micro-organismes mais joue un rôle prépondérant dans le maintien de l'homéostasie intestinale. Parmi cette flore intestinale, nous retrouvons *Candida albicans* et *Candida glabrata*, des levures commensales et saprophytes du tube digestif humain, capables de coloniser de manière excessive la muqueuse digestive par association avec d'autres facteurs (altération de la flore intestinale, de la muqueuse digestive ou un déficit immunitaire) amenant à favoriser la translocation des levures à travers la barrière épithéliale digestive. Or, le tube digestif est considéré comme le réservoir principal de l'infection par *Candida* et il est admis que les candidoses disséminées ont pour origine essentiellement le tube digestif. Les possibilités de dissémination dans la circulation sanguine conduisent à des formes graves de candidoses disséminées. D'ailleurs, ce sont les levures du genre *Candida* qui posent les problèmes médicaux les plus aigus, notamment dans les services hébergeant des patients à prise en charge lourde. Selon les études, les *Candida* se situent au quatrième rang des agents infectieux responsables d'infections nosocomiales. La mortalité des candidoses systémiques est estimée entre 10% et 40% selon les populations de patients. De plus, leur morbidité entraîne des prolongations de séjours de plus en plus fréquentes et le coût des antifongiques dont la plupart sont prescrits à visée empirique ou prophylactique croît de manière exponentielle. Les recherches conduites au sein de l'équipe ont permis de suggérer l'implication de *Candida* dans l'aggravation de la maladie de Crohn (MC). En effet, notre équipe a pu successivement démontrer que i) les patients atteints de la MC ont un taux élevé d'anticorps anti-levures ii) le nombre de ces anticorps et leur amplitude sont corrélés avec la sévérité de la MC, iii) la colonisation digestive accrue par *Candida* chez les patients atteints de la MC et leurs parents sains du premier degré. Il était important de compléter ces recherches par un volet expérimental afin d'approfondir nos connaissances sur les processus inflammatoires associés à la colonisation/infection par *Candida* ainsi que les interactions établies entre *Candida* et le microbiote dans un contexte inflammatoire. Pour cela, nous avons développé un modèle de colonisation par *Candida* chez des souris ayant subi un traitement au dextran sodium sulfate (DSS) afin d'induire une inflammation du côlon. En effet, l'utilisation d'un modèle animal en présence de colite induite par DSS permet de mieux comprendre les mécanismes cellulaires de l'inflammation associée à la rectocolite hémorragique et de déterminer le niveau de virulence des souches fongiques dans un contexte de lésions inflammatoires touchant l'épithélium intestinal. Dans ce modèle, nous allons également déterminer le rôle des polysaccharides fongiques et de leurs anticorps afin de mieux comprendre leurs influences dans les interactions observées entre le

microbiote et *Candida* et de préciser leurs rôles vis-à-vis de la réponse immunitaire suite à la colonisation/infection par *Candida*.

Ces recherches importantes pour définir de nouvelles stratégies préventives des candidoses invasives sont de mise en œuvre difficile chez l'Homme. Nous voulons réaliser trois expériences consécutives sur des souris. Chaque lot est composé de 60 souris (pour un total de 180 souris). Cet effectif de souris est nécessaire afin de confirmer une différence significative entre les groupes de souris contrôles et les souris en présence des polysaccharides fongiques et de leurs anticorps en termes d'infection/colonisation par les levures du genre *Candida*. En effet, cinq souris sont nécessaires pour les groupes témoins, dix pour les groupes traités par DSS afin d'obtenir des résultats fiables par le biais des analyses statistiques.

Notre projet respecte les règles des 3R. Nous avons essayé de réduire le nombre des souris utilisées dans ce travail par la mise au point d'un modèle *in vitro* basé sur l'utilisation des cellules intestinales cancéreuses humaines (modèle cellulaire Caco-2). Dans ce modèle de culture cellulaire *in vitro*, nous avons observé l'implication des polysaccharides fongiques dans l'homéostasie intestinale et l'élimination de *Candida* spp. Ce modèle *in vitro* nous a donc permis de nous intéresser aux rôles des polysaccharides fongiques. Pour compléter ces observations, nous aurons besoin d'utiliser ces souris afin de vérifier l'implication du système immunitaire au cours de l'inflammation intestinale et l'infection fongique. L'impact du système immunitaire dans la génération des différents anticorps antifongiques sur l'inflammation/colonisation par *Candida* spp sera étudié dans ce travail, étant précisé que cette étude inflammation intestinale/infection/colonisation n'est pas réalisable dans le modèle *in vitro*. Par ailleurs, pendant toute la durée de l'expérience, une évaluation clinique quotidienne permettra de dépister la souffrance animale. Les animaux seront euthanasiés en cas d'atteinte du point limite. De plus, les souris seront hébergées par cage de cinq dans des conditions optimales présence de jouets, accès libre à la nourriture et à l'eau de boisson.

15114 Avec plus de 80% de la mortalité cardiovasculaire survenant chez des individus de plus de 65 ans le vieillissement représente un facteur de risque majeur des maladies cardiovasculaires. Les vaisseaux sanguins sont composés de plusieurs couches cellulaires dont la média qui correspond à la couche intermédiaire de cette structure et est composée des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV). Dans les maladies cardiovasculaires telles que l'athérosclérose on observe une obstruction progressive de la lumière artérielle qui est appelée l'hyperplasie intimale. Celle-ci est due à une multiplication anormale des CMLVs. Les mécanismes impliqués dans ce processus ne sont pas complètement connus mais un grand nombre de composés sont capables d'influencer la prolifération des CMLVs. Des études ont montré que les acides gras polyinsaturés oméga-3 procure un effet protecteur au niveau cardiovasculaire notamment en jouant un rôle dans la résolution des phénomènes inflammatoires engendrés par le vieillissement vasculaire. Pour étudier ces mécanismes, nous nous focaliserons sur la résolvine D2 ainsi que son récepteur membranaire spécifique GPR18. Ces molécules vont permettre la transmission d'informations à l'intérieur de la cellule (transduction du signal). Ces informations agissent sur différents paramètres cellulaires tels que la prolifération, la migration cellulaire ou encore la régulation du phénotype des cellules, Lorsque la régulation de ces paramètres est modifiée ils peuvent être impliqués dans des pathologies.

Dans ce contexte physiopathologique, nous nous intéressons à l'implication de la résolvine D2, composé dérivé du métabolisme des oméga-3, dans les mécanismes de la formation de la néointima (tissus cicatriciel) et l'interaction résolvine D2 / CMLVs dans un modèle d'hyperplasie intimale résultant d'un phénomène inflammatoire.

Nous utiliserons deux lignées de souris dans ce projet une lignée qui exprime normalement l'intégralité de ses gènes et une lignée de souris invalidées pour le récepteur GPR18. Ainsi le rôle de ce récepteur sera étudié chez des animaux suivant un régime alimentaire classique ou un régime alimentaires riches en graisses et en sucres, ce dernier permettant d'induire un vieillissement vasculaire accéléré.

Il est extrêmement difficile d'obtenir des prélèvements d'artères fémorales sains et pathologiques de patients présentant une hyperplasie intimale, nous utiliserons donc pour cette étude des souris

ayant subi une déendothélisation réalisée à l'aide d'un guide d'angioplastie suite à une ligature transitoire de l'artère fémorale. Cette méthode permet également d'engendrer des lésions qui ne peuvent être obtenus que par des méthodes invasives chez l'animal. De plus, seuls les modèles murins proposent des animaux invalidés pour le récepteur GPR18 qui vont nous permettre d'étudier la voie de signalisation de ce récepteur.

Il est prévu d'utiliser 92 souris au total en tenant compte des études *in vivo* et *ex vivo* réparties en 4 groupes

Groupe 1 souris C57BL/6 GPR18 +/- régime alimentaire pauvre en graisse

Groupe 2 souris C57BL/6 GPR18 +/- régime alimentaire riche en graisses et fructose

Groupe 3 souris C57BL/6 GPR18 -/- régime alimentaire pauvre en graisse

Groupe 4 souris C57BL/6 GPR18 -/- régime alimentaire riche en graisses et fructose

Dans le cadre du respect de la règle des 3R

- Afin de limiter le nombre d'animaux, plusieurs types de mesures seront effectuées sur un même animal. Toutes les expériences invasives se feront sous anesthésie gazeuse (isoflurane en traitant la douleur si nécessaire par injection sous-cutané de buprénorphine, 10 min avant la procédure puis 8 heures après). 23 animaux par groupes subdivisés en deux groupes (16 + 7) sont nécessaires afin de ne pas compromettre les objectifs du projet et de pouvoir réaliser de bonnes analyses statistiques. Des tests statistiques non paramétriques adaptés pour des petits effectifs seront utilisés pour analyser les données.

Si l'un de ces points limite est observé, l'animal sera mis à mort (méthode de mise à mort idem 3.3.3) :

- Perte de poids de 10 à 15% sur 3 jours consécutifs
- Isolement
- Immobilité
- Yeux et abdomen creux
- Ouverture des sutures de chirurgie
- difficultés respiratoires
- prostration supérieure à 2 heures

Dans la mesure où une perte de poids est fréquemment observée suite à une chirurgie, l'animal sera exclu du protocole et mis à mort si elle est accompagnée, dans les 48h suivant l'opération, de 2 autres signes tels que

- Yeux fermés
- Dos voûté
- Poils hérissés
- Déshydratation.
- Pour le raffinement, les animaux ne seront pas manipulés dans la même pièce que celle où ils sont hébergés. Les souris seront hébergées de 1 à 5 par cages individuellement ventilées. Elles seront nourries *ad libitum* avec les croquettes. La litière sera changée une fois par semaine. L'enrichissement du milieu se fera avec du papier plissé et bâtonnets de bois.

15115 L'objectif de ce projet est de produire des sérums d'origine aviaire spécifiques de différents virus ceux-ci seront utilisés comme réactifs pour la détection, le contrôle et la prévention des infections des oiseaux provoqués par ces mêmes virus.

Le recours aux animaux est la seule façon d'obtenir ces sérums. Toutefois, afin de produire la quantité optimale d'anticorps spécifiques, les poulets exempts d'organismes pathogènes spécifiés (EOPS) utilisés sont inoculés deux ou trois fois de suite avec différents antigènes inactivés. Les injections pratiquées sont sans effet sur la santé des animaux, qui disposent par ailleurs de conditions et d'un environnement d'élevage adaptés à leurs besoins. Ce recours à plusieurs

inoculations permet de réduire le nombre d'animaux au minimum, qui sera de 1200 pour ce projet de cinq ans.

15116 Les maladies neurodégénératives dont la maladie d'Alzheimer, d'Huntington et les ataxies spinocérébelleuses (SCA) sont une préoccupation croissante en santé publique. Malgré d'importants efforts de recherche, il n'existe encore aucun traitement capable de combattre de façon efficace la progression de ces maladies.

Des nouvelles approches thérapeutiques sont essentielles pour progresser dans la prise en charge de patients. Parmi ces nouvelles approches thérapeutiques prometteuses se trouvent la thérapie génique. Elle utilise l'ADN pour soigner ou prévenir de la maladie. Selon la pathologie, cet objectif peut être atteint en délivrant aux cellules un gène à action thérapeutique (transgène) qui surexprime la protéine déficiente dans la maladie. Ces acides nucléiques sont le plus souvent transportés dans les cellules grâce à un vecteur viral. La preuve de concept de cette stratégie dans des modèles murins pour ces maladies neurodégénératives a déjà été montrée.

L'objectif de ce projet est donc d'évaluer la faisabilité et l'efficacité de l'administration par thérapie génique à l'aide d'un vecteur adéno-associé (AAV), dans le but de choisir le sérotype viral ainsi que la voie et le lieu d'administration les plus appropriés pour cibler la région d'intérêt.

Le choix de l'espèce est basé sur son homologie avec l'homme, au niveau des plans anatomiques et fonctionnels du système nerveux central (SNC) et du point de vue immunitaire (tolérance semblable).

3R Comme précédemment décrit, il nous est impossible de remplacer l'animal par une simulation informatique ou d'autres méthodes expérimentales car le cerveau du primate non humain (PNH) est un organe plus complexe par rapport aux rongeurs et plus proche du cerveau humain (taille et anatomie). Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. L'application de critères d'arrêts standards en élevage/utilisation, et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe certifient le bien-être des animaux. De plus, en cas d'observation de la moindre douleur, les animaux recevront un traitement analgésique et anti-inflammatoire, et si cette douleur devait persister, les animaux seraient euthanasiés pour éviter toute souffrance.

Tous les animaux seront nés et élevés en captivité dans des élevages agréés, une période d'acclimatation de 2 semaines est observée à l'arrivée des animaux. Le présent projet limitera le nombre d'animaux au strict minimum 20 PNH, et veillera à ce qu'ils ne souffrent ni des procédures d'administration des vecteurs AAV, ni de la présence d'AAVs dans leurs organes. Des examens cliniques journaliers et l'application de critères d'arrêt de protocole permettront de veiller au bien-être des animaux.

Les procédures chirurgicales seront effectuées par un groupe composé de biologistes/ingénieurs spécialistes de la neurochirurgie et 2 neurochirurgiens. Cela garantira la faisabilité/qualité des gestes chirurgicaux, leur efficacité et la maîtrise de l'anesthésie et de l'analgésie. L'utilisation de méthodes non-invasives, en particulier d'imagerie *in vivo* (IRM), pour repérer les sites d'injection avant la chirurgie et pour vérifier si le produit thérapeutique est bien toléré, renforcera la qualité des interventions et leur efficacité.

15117 Dans le domaine médical, le diagnostic d'une pathologie repose en partie sur l'établissement de valeurs de référence. C'est également le cas en médecine vétérinaire, et de nombreuses données ne sont pas encore connues chez le cheval. Dans ce contexte, un lot de chevaux sains va être utilisé pour déterminer différentes valeurs de référence d'inflammation pulmonaire post-anesthésie, de pression sanguine pendant une anesthésie, de pression sanguine par échographie et d'inflammation digestive.

L'effet de l'anesthésie générale et de l'intubation trachéale sur l'inflammation pulmonaire est inconnu chez le cheval. Les connaissances sur ce point permettront de diagnostiquer plus précocement des complications de pneumonie post-anesthésie, qui sont potentiellement sévères et fatales.

La mise au point d'une mesure non-invasive de la pression veineuse centrale pourrait être un outil diagnostique très utile en clinique pour traiter au mieux les chevaux déshydratés. La mesure de l'hydratation du cheval est compliquée et nécessite la pose d'un cathéter veineux central. D'autres options plus simples sont possibles, comme la mesure de la pression jugulaire (pendant une anesthésie), ou les changements du diamètre de la veine jugulaire à l'échographie sur cheval vigile. Elles nécessitent d'être validées chez le cheval.

Les maladies inflammatoires des intestins, comparables à la maladie de Crohn chez l'Homme, sont de plus en plus diagnostiquées chez le cheval, mais il manque des critères objectifs et fiables pour évaluer la sévérité de la maladie. La détermination d'un score histologique de sévérité de l'inflammation intestinale permettra de mieux informer les propriétaires sur les chances de survie, et donnera des critères objectifs de la réponse au traitement ainsi qu'un outil utilisable pour d'éventuels futurs projets de recherche.

Le premier objectif est de caractériser l'effet de l'anesthésie générale sur les poumons des chevaux, et de décrire les paramètres cliniques, hémato-biochimiques et d'imagerie pulmonaire acceptables suite à une anesthésie sans complication. Les données recueillies permettront de diagnostiquer plus précocement une pneumonie suite à une anesthésie générale. Le deuxième objectif, annexe, est d'estimer la validité de la mesure de la pression dans la veine jugulaire comme outil de mesure de l'hydratation du cheval pendant une anesthésie. Ces deux objectifs seront réalisés lors des mêmes procédures. Avant et après les anesthésies générales, les chevaux auront différents prélèvements (prises de sang, lavage trachéal) et examens (échographie, radiographie) qui sont les mêmes que réalisés en routine sur les chevaux de propriétaire. Les examens d'imagerie sont non-invasifs (échographie, radiographie). Les chevaux seront ensuite anesthésiés pendant 1h30. La mesure de la pression jugulaire sera réalisée durant l'anesthésie, à l'aide de la pose d'un autre cathéter qui sera enlevé en fin d'anesthésie. Le protocole d'anesthésie sera le même que pour les chevaux admis pour chirurgie de convenance. L'ensemble des examens pré-anesthésie sera répété le lendemain de l'anesthésie.

Le troisième objectif est d'estimer la validité de l'échographie de la veine jugulaire sur cheval vigile comme outil de mesure de l'hydratation du cheval. Il sera réalisé lors d'un prélèvement sanguin requis pour cause médicale (transfusion sanguine d'un patient hospitalisé) et nécessitera la pose d'un cathéter veineux supplémentaire pour mesurer la pression sanguine. L'autre veine sera échographiée pendant la procédure qui durera 1h.

Le quatrième objectif est d'établir un score de sévérité de la maladie inflammatoire des intestins sur des biopsies digestives. Des chevaux malades ont déjà été inclus dans une autre étude, mais des chevaux sains sont nécessaires pour valider ce score. Cela nécessite donc de s'assurer que le système digestif des chevaux fonctionne normalement en réalisant un test d'absorption du glucose, puis de réaliser des biopsies digestives. L'ensemble des procédures durera une demi-journée pour chaque cheval.

Toutes les procédures réalisées sont les mêmes que celles effectuées sur des animaux présentés en consultation, et sont soit peu invasives (pose de cathéters intra-veineux, prise de sang, anesthésies générales, endoscopies, biopsies) ou non-invasives (radiographies, échographies). Hormis une complication exceptionnelle, il n'y aura pas de dommage.

La durée de l'étude au total est estimée à 2 ans (temps de recrutement des chevaux pour l'étude).

Le projet sera réalisé uniquement sur des chevaux adultes en bonne santé. L'étude ne peut être réalisée sur d'autres espèces étant donné les particularités anatomiques du cheval car cela rendrait les résultats peu transposables à cette espèce. Il n'y a pas de modèle *in vitro* disponible pour les maladies étudiées.

Le nombre d'animaux utilisés a été estimé à 10 en se basant sur les variations attendues d'inflammation pulmonaire et de pression veineuse. Des chevaux pourront être utilisés dans plusieurs protocoles.

Pendant l'étude, les chevaux ont des conditions d'entretien classiques (logement au box sur une litière paillée, nourriture normale (foin et granulés), congénères en visuel, sorties 2 fois par jour). Les chevaux seront sortis du projet en cas d'anomalies (examens initiaux anormaux, complication

pendant l'anesthésie, signes d'intolérance pendant le prélèvement sanguin). Pour les chevaux recrutés dans différentes procédures, le temps nécessaire sera alloué entre chaque procédure (24h de repos après une anesthésie générale, 3 mois sans prélèvement de sang pour une éventuelle transfusion dans l'objectif 3). Des sédations légères pourront être réalisées pour certaines procédures si le cheval est intolérant. Les complications seront traitées comme un cheval de client. A la fin du projet, les chevaux sont repris par le fournisseur et pourront continuer leur carrière sportive par la suite sans effet délétère des procédures effectuées.

15118 L'acidémie méthylmalonique (MMAuria), est une maladie d'origine génétique causée par la déficience d'une enzyme, la méthylmalonyl-CoA mutase (MUT), qui induit un développement anormal et des crises métaboliques pouvant mener au coma voir à la mort péri-natale chez l'homme. Les survivants présentent tout de même un risque de décompensation métabolique et des complications à long terme sévères, notamment des insuffisances rénales et des désordres neurologiques. Outre les traitements symptomatiques, il existe quelques approches thérapeutiques incluant une réduction de la consommation de protéine et une supplémentation en carnitine afin de limiter la formation de métabolites toxiques. Cependant, bien que ces approches améliorent partiellement le contrôle métabolique chez certains patients, la plupart souffrent tout de même de complications à long terme. Il existe ainsi un vrai besoin de développer des thérapeutiques spécifiques de la MMAuria.

L'étude décrite dans le présent dossier sera réalisée dans le cadre du développement deux composés en développement, destinés à l'amélioration de l'acidémie méthylmalonique et de ses complications associées. L'objectif de la présente étude sera d'évaluer l'impact de ces composés sur la prise alimentaire, le poids corporel, la composition corporelle, les dépenses énergétiques, l'activité locomotrice et la force musculaire (par grip test) chez un modèle génétique murin de MMAuria (souris Mut ko/ki). Ce modèle présente des similarités avec la pathologie humaine. Les souris Mut ko/ki sont indiscernables de leurs contrôles jusqu'à l'âge de 100 (femelles) ou 150 (mâles) jours, âge à partir duquel les souris commencent à présenter un retard de développement aboutissant à 30% de réduction du poids corporel à 1 an sans modification de leur prise alimentaire (suggérant une augmentation des dépenses énergétiques) et une faiblesse musculaire. Elles se caractérisent également par une augmentation des taux urinaires de MMA du fait de la réduction de l'activité de la MUT. Avant 1 an, et malgré les défauts précités, le phénotype des souris n'est pas dommageable.

La présente étude nécessitera l'emploi de 80 souris (16 souris wild type et 64 souris Mut ko/ki sous fond génétique C57Bl/6) réparties en 10 groupes expérimentaux composés de 8 animaux.

La règle des 3Rs a été prise en compte dans l'élaboration du présent protocole

- Raffinement : Le modèle animal qui sera utilisé est un modèle caractérisé dans la littérature et dont le phénotype a été décrit. Ce modèle s'avère d'intérêt majeur dans le cadre d'études précliniques cherchant à mettre en évidence les effets bénéfiques de composés sur la MMAuria. Le protocole a été planifié de façon à limiter au maximum tout stress et tout inconfort pour les animaux. Notamment, les souris seront utilisées à l'âge de 22 semaines au début du protocole et seront âgées de 28 semaines à l'issue du protocole, permettant de s'affranchir des événements tardifs de la pathologie et ainsi de ne pas laisser le phénotype devenir dommageable pour l'animal.

Pour des raisons techniques (mesures de dépenses énergétiques et de prise alimentaire), les animaux seront hébergés en cages ventilées individuelles mais un enrichissement du milieu sera assuré par l'ajout d'igloos et de matériels de nidification. Enfin, un suivi journalier des animaux à l'aide d'une grille de score permettra une action rapide en cas d'atteinte des points limites établis.

- Réduction : Le nombre d'animaux utilisés a été rationalisé à partir des données de la littérature, de façon à être en mesure de mettre en évidence une différence statistiquement significative sur les paramètres étudiés.

- Remplacement : L'utilisation d'animaux à des fins scientifiques se justifie ici car il n'existe aucune méthode de substitution n'utilisant pas l'animal de laboratoire et permettant l'étude de l'impact d'un composé sur la MMAuria.

15119 Les systèmes agroforestiers sont reconnus depuis quelques années dans le cadre de l'atténuation du changement climatique, notamment en climat tropical (accords de Kyoto par exemple). Les travaux menés sur ces systèmes sont considérés comme des options crédibles pour la lutte contre le changement climatique. L'importance de ces systèmes sur le volet adaptation en climat tempéré est par contre moins étudiée.

Sur le terrain, depuis la réforme des réglementations engagée en 2001, le nombre de projets récents progresse et leur surface dépasse les 10 000 ha en 2012. Cette augmentation pose la question de l'accompagnement sur le terrain et soulève surtout de nouvelles questions de recherche, notamment dans une perspective de prise en compte grandissante de l'agroécologie. L'agroforesterie est d'ailleurs citée comme un système de production adapté aux enjeux agro-environnementaux actuels, et devant faire l'objet d'une recherche approfondie.

Pour le secteur de l'élevage, dans un contexte de changement climatique, responsable en partie de la stagnation des rendements agricoles, de périodes de canicules de plus en plus fréquentes, les éleveurs doivent faire face à un contexte économique difficile. Ceci couplé à des sécheresses régulières qui affectent l'autonomie fourragère et plus globalement l'autonomie alimentaire, ces évolutions fragilisent de plus en plus les exploitations.

Dans un futur proche l'allongement des périodes de pâturage est considéré comme l'une des clés d'adaptation des systèmes d'élevage herbivores pour répondre aux évolutions de contexte qu'il soit climatique ou économique. L'allongement de la durée de pâturage, vers des périodes de moindre production fourragère, sur prairies ou sur parcours, permet des économies importantes en fourrages stockés et en concentrés sans dégrader les performances des animaux.

L'implantation d'arbres en prairie peut avoir une influence considérable en modérant la température de l'air et du sol, en accroissant l'humidité relative et d'autre part, en limitant l'évapotranspiration et le stress azoté des cultures. Ces effets bénéfiques à la croissance des cultures sont mis à profit dans de nombreux systèmes d'agroforesterie. Par transposition aux exploitations d'élevage herbivore, l'arbre serait un réel élément de soutien et d'adaptation au changement climatique pour les prairies pâturées par des ruminants mais également en assurant un rôle de protection des animaux vis-à-vis des intempéries ou du soleil durant les périodes hivernales et estivales.

L'expérimentation que nous voulons mettre en place a pour objectif de quantifier l'intérêt de l'arbre dans des prairies pâturées par des ovins. Elle s'étalera sur 5 mois soit toute la période de pâturage et utilisera 36 brebis adultes, sera reconduite deux années consécutives, on utilisera toujours les mêmes brebis, ce qui mobilisera un total 36 animaux sur la durée du projet. Les animaux seront allotés en trois lots de 12 brebis et alloué à l'un des trois traitements suivants (1) un lot témoin dit nu (une prairie avec un seul arbre isolé de façon à avoir un minimum d'abri pour les animaux), (2) traitement à densité moyenne (une parcelle avec 60arbres /ha), et (3) traitement avec une haie (sur le côté sud de la parcelle pour avoir de l'ombre et de l'abris en permanence). La taille des parcelles (traitements) est de 0.8ha pour permettre la mise en place d'un pâturage tournant, pratique très courant en élevage. Il comprendra 3 périodes de pâturage dans les parcelles expérimentales séparés chacune par une période de quinze jours durant lesquels les animaux seront placés dans un environnement similaire pour vérifier toute dérive des capteurs. De plus, en début d'essai, une période de 15 jours sera faite pour habituer les animaux à leur environnement et au changement de régime alimentaire (passage de la bergerie à la pâture, régime foin à l'herbe). Les trois périodes expérimentales se dérouleront de la façon suivante

-1^{ère} phase du 1/06 au 21/06/2020.

-2^{ème} phase du 06/07/2020 au 26/07/2020.

-3^{ème} phase du 10/08/2020 au 30/08/2020.

La règle des 3R a été prise en compte durant toute la durée d'élaboration du projet et de cette demande, premièrement il n'est pas possible de remplacer l'animal dans cette étude car il n'existe pas de méthode alternative fiable pour valider nos objectifs scientifiques. Deuxièmement les effectifs animaux ont été limités et réduits au maximum tout en permettant d'obtenir des résultats fiables et en permettant aux animaux d'exprimer des comportements sociaux normaux. Troisièmement, tout est mis en œuvre pour raffiner les procédures expérimentales, en privilégiant

des mesures ou procédures peu invasives pour l'animal utilisant notamment des colliers et des capteurs mesurant l'activité en continu des animaux.

Pour limiter le stress et la douleur des animaux durant la réalisation de la procédure, ils feront l'objet d'une couverture antalgique ainsi qu'une anesthésie locale associée à une légère sédation. Pas d'autres dispositions particulières seront prises, si ce n'est que les animaux seront surveillés quotidiennement par du personnel qualifié pour déceler tout changement anormal de comportement (comportement général, apathie, boîterie).

15120 Le Cancer des Voies Aériennes et Digestives Supérieures (VADS) est classé au 6ème rang des cancers avec une incidence de 600 000 cas par an dans le monde et une mortalité de 380 000 cas par an. Les principaux traitements sont la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie avec les meilleurs taux de survie obtenus avec la chirurgie. L'exérèse tumorale complète en marges saines améliore le pronostic et réduit le taux de récurrence.

Actuellement lors de l'exérèse chirurgicale, les marges tumorales sont définies par le chirurgien par inspection macroscopique et palpation de la tumeur, complété de l'analyse histologique extemporanée des recoupes par l'anatomopathologiste.

Le domaine du Short Wave InfraRed (SWIR) est intéressant car il permet de s'affranchir de l'injection de fluorophore grâce à l'exploitation de chromophores endogènes. Notre objectif est de tester ce système de caméra optique pour analyser les tissus et distinguer le tissu tumoral du tissu sain dans les cancers des VADS.

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.

Ce modèle consiste à injecter premièrement des cellules tumorales en sous cutanées (flanc de la souris), surveiller la croissance tumorale et le bien-être de la souris puis dans un second temps nous explantons la tumeur afin d'en implanter un échantillon dans la cavité buccale d'autres souris. Nous réaliserons ensuite l'exérèse de la tumeur avec l'aide de la caméra SWIR.

Au total, pour cette étude, nous aurons besoin de 56 souris.

Remplacer A ce stade du projet, tous les tests *in vitro* ont été effectués, il est indispensable d'intégrer le fait que les cellules se développent dans un organisme vivant. Le modèle murin nous semble le plus approprié, il permet de se rapprocher d'un grand nombre des caractéristiques de la pathologie humaine.

Réduire : Le nombre de souris a été estimé sur la base de calculs de puissance, déterminés mêmes à partir des informations disponibles dans la littérature. Nous l'avons déterminé comme étant le nombre minimum de souris nécessaires pour obtenir des résultats statistiquement significatifs.

Raffiner Nous utiliserons des souris NMRI nu/nu, qui représentent le modèle le plus proche de la physiopathologie humaine, permettant le développement de modèles tumoraux humains sans phénomène de rejet. Les animaux sont hébergés en groupes sociaux, dans un environnement contrôlé dépourvu de pathogènes, enrichi avec des tunnels en carton et morceaux de papier pour y faire un nid. La nourriture et l'eau de boisson sont fournies ad libitum. Toutes les expériences pouvant entraîner gêne ou douleur seront effectuées sous anesthésie gazeuse. La croissance des tumeurs sous cutanées n'entraîne pas de gêne de mobilité et sera suivie par mesure au pied à coulisse. L'application de critères d'arrêt et le suivi quotidien des animaux garantiront leur bien-être.

15121 Les syndromes myélodysplasiques (SMD) sont des maladies touchant la moelle osseuse et sont responsables d'un manque de cellules du sang. Elles peuvent évoluer et se transformer en leucémie aiguë myéloïde. Le manque de globules rouges (anémie) représente la complication majeure des SMD nécessitant des transfusions de globules rouges. La fabrication des cellules du sang a lieu dans la moelle osseuse. Les cellules à l'origine des cellules du sang, par multiplication et différenciation, s'appellent les cellules hématopoïétiques (CSH). Ces dernières ne sont pas seules

au sein de la moelle osseuse mais entourées d'autres cellules dites non hématopoïétiques qui composent le microenvironnement médullaire et qui a un rôle de soutien. Ce microenvironnement médullaire peut protéger les cellules tumorales de molécules thérapeutiques. Actuellement 2 nouvelles molécules, le Venetoclax et le Pevonedistat ont montré des résultats très encourageants chez des patients atteints de SMD mais on voit émerger des résistances à ces drogues. Nous proposons d'évaluer les mécanismes de résistances au pevonedistat et au venetoclax des SMD induit par le microenvironnement médullaire dans un modèle de souris greffées avec des cellules souches humaines.

Il est impossible, à l'heure actuelle, de reproduire de manière *in vitro* une hématopoïèse clonale d'un syndrome myélodysplasique avec tous les composants de la niche hématopoïétique pour étudier les mécanismes de résistance au Pevonedistat et au Venetoclax médié par ce microenvironnement médullaire. Par ailleurs, aucun modèle mathématique ou informatique ne permet actuellement d'évaluer également cette réponse.

L'ensemble de ces procédures pouvant s'accompagner d'une douleur/angoisse modérée, tous les efforts seront entrepris pour réduire au minimum toute douleur, souffrance ou angoisse ressentie par les animaux. C'est pourquoi nous surveillerons l'état de santé des animaux tout au long des expériences afin de pouvoir intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de douleur, de souffrance ou d'angoisse. La greffe des cellules souches humaines sera réalisée sous anesthésie générale par utilisation d'analgésiques. De plus, le nombre d'animaux nécessaire à cette étude a été réduit au minimum, sur la base des besoins imposés par les tests statistiques que nous utiliserons. De fait, un nombre total de 60 souris sera nécessaire. Cette étude nous permettra d'évaluer les mécanismes de résistance au Pevonedistat et au Venetoclax médiés par le microenvironnement médullaire.

15122 En Europe, le traumatisme crânien (TC) est la cause la plus fréquente d'invalidité permanente chez les patients de moins de 40 ans. Aux lésions cérébrales primaires, engendrées par l'impact, se surajoutent, pendant les heures et les jours qui suivent, des lésions secondaires liées aux agressions cérébrales d'origine systémique. Certains travaux ont montré que les patients traumatisés crâniens étaient à risque de développer un syndrome post-commotionnel précocement après le TC. Ce syndrome est l'association de troubles somatiques (céphalées, vertiges, tremblements, déficits sensitivomoteurs) et psychiatriques (irritabilité, agitation, agressivité, troubles mnésiques, comportements à risque) pouvant avoir un retentissement socio-professionnel important. Chez l'enfant, le traumatisme comporte certaines spécificités dues à l'immaturation du cerveau et pourrait notamment être responsable de troubles du développement psychomoteur.

L'objectif de ce projet est donc d'évaluer le retentissement clinique d'un TC modéré de l'enfant. Pour cela, nous utiliserons un modèle de TC modéré par lâcher de poids chez le souriceau mâle à sept jours de vie. Dans ce modèle, nous rechercherons au stade juvénile-jeune adulte (entre 45 et 65 jours de vie), la présence de traits comportementaux en rapport avec la dépression et l'anxiété grâce à une série de différents tests adaptés. A la fin des tests comportementaux, les cerveaux seront prélevés afin d'effectuer les études immuno-histochimiques.

Le nombre de souris utilisées sera de 80 dans ce projet d'une durée de trois ans.

Malheureusement, les analyses *in silico* ou *in vitro* ne permettent pas à ce jour de modéliser ni la complexité du cerveau ni d'étudier les répercussions comportementales d'un TC modéré localisé. Aussi, le recours au modèle animal est indispensable pour ce projet.

Ce projet s'effectuera dans le respect de la règle des 3R, en veillant au bien-être des animaux et en limitant leur douleur. Pour réduire le nombre d'animaux, nous avons estimé la taille des échantillons permettant une puissance statistique suffisante grâce aux données collectées au cours d'expériences précédentes. Pour éviter toute souffrance la procédure de TC est effectuée sous anesthésie générale. Après le trauma, une prise en charge de la douleur sera effectuée et les animaux seront observés quotidiennement et évalués à l'aide de points limites bien définis.

15123 L'élevage des animaux dans le respect de leurs besoins fondamentaux et de leur bien-être exige un personnel compétent. Pour cela, il se doit de connaître les espèces qu'il est susceptible de manipuler, entretenir et élever. L'acquisition de ces connaissances impose une formation complète que ce soit de la physiologie de l'animal, de son alimentation, des conditions de son élevage mais également de son comportement et de son anatomie. C'est pour cela que le législateur a souhaité que la formation du personnel assurant les soins aux animaux comporte une partie de travaux pratiques permettant au personnel en formation d'acquérir les bons gestes mais aussi une connaissance suffisante pour distinguer les signes éventuels de stress ou de souffrance. C'est dans ce but que ce projet d'enseignement pratique a été conçu. Huit sessions de formation par an sont prévues. Chaque session sera composée de 10 personnes travaillant en binôme. Chaque binôme disposera d'un animal, rat ou souris, mâle ou femelle. Les personnes pourront aller d'un atelier à l'autre de façon à se familiariser à la manipulation de tous les types d'animaux sans jamais réaliser d'acte susceptible d'engendrer une douleur ou un stress. Ainsi, pour chaque séance de travaux pratiques, 5 animaux seront utilisés. Ainsi, sur 5 ans, 200 animaux au total seront utilisés sur ce projet. Après avoir été manipulés sans aucune utilisation de protocole invasif, ces animaux seront mis à mort selon les préconisations de la Directive 2010/063. Une fois la mort vérifiée, ils seront autopsiés de façon à étudier les différents systèmes anatomiques. Pour cette formation, les animaux utilisés sont issus des animaux de réforme issus de notre élevage et qui sont normalement destinés à l'alimentation des reptiles et rapaces.

15124 L'objectif de ce projet est de produire, à partir de sérum de lapin, un immunosuppresseur sélectif utilisé pour lutter contre les rejets de greffe chez l'Homme en période pré et post opératoire, ainsi que pour traiter l'aplasie médullaire.

Le médicament est utilisé depuis les années 1980 (usage hospitalier uniquement). L'AMM définit le protocole de production du médicament et fige les modalités d'obtention de la matière active (dispositions communes à tout dossier réglementaire lié à l'agrément d'un médicament).

Le recours au lapin en tant qu'animal producteur d'anticorps polyclonaux a été évalué lors du développement du produit.

Le nombre total de lapins nécessaires à ce projet est de 123 000 animaux sur 5 ans.

La mise en oeuvre de la règle des 3R (art R214-105) sera respectée selon

- l'application d'une procédure expérimentale définie pour obtenir la plus grande quantité de sérum (contenant la concentration requise en anticorps) possible par animal l'utilisation des lapins mâles et femelles, (REDUCTION)

- l'absence de modèle alternatif au lapin pour la production des anticorps polyclonaux à l'heure actuelle des connaissances scientifiques, (REPLACEMENT)

- l'utilisation d'un hébergement adapté (respectant le Bien Etre animal et bénéficiant d'un enrichissement sous forme de bûchettes de bois à ronger) la réalisation du suivi quotidien des animaux par des personnes expérimentées et formées régulièrement une prise en compte et une évaluation de la souffrance animale en référence à une grille fixant les points limites et permettant de cesser l'expérimentation immédiatement sur tout lapin présentant des signes de souffrance dépassés une prise en charge de la douleur des animaux au cours de la procédure avec l'application d'un protocole d'anesthésie validé lors du dernier prélèvement de sang (RAFFINEMENT).

15125 L'insuffisance rénale chronique (IRC) est un problème majeur de santé publique mondial, pour lequel nous ne disposons toujours pas de marqueur pronostique précoce ou de traitement efficace. L'IRC est caractérisée par un déclin progressif de la fonction de filtration du sang par le rein, sur plusieurs mois voire plusieurs années. C'est donc une maladie qui reste silencieuse pendant une longue période. Lorsque le patient développe des symptômes, il est souvent trop tard car une grande partie du rein est alors détruite et ne peut être réparée. Les seuls traitements disponibles sont alors la dialyse ou la greffe de rein, deux stratégies lourdes, avec un impact émotionnel significatif pour le patient et sa famille.

Les causes de l'IRC sont multiples. Au laboratoire, nous nous intéressons à deux des causes principales l'ischémie-reperfusion (IR, diminution ou interruption du flux sanguin suivie de son rétablissement) et les maladies du glomérule, l'unité qui filtre le sang dans le rein.

Plusieurs études suggèrent que la sérine-thréonine kinase WNK1 [With No lysine (K) kinase] pourrait être impliquée dans le développement d'une IRC suite à une IR. Exprimée dans tous les organes, WNK1 joue un rôle central dans le maintien de l'équilibre cellulaire en régulant les entrées et sorties d'ions comme le sodium, le potassium et le chlorure. WNK1 stimule ainsi la contractions des artères et l'augmentation de la pression artérielle. L'expression de WNK1 est stimulée par l'aldostérone, une hormone produite par la glande surrénale en réponse à diverses situations physiologiques ou pathologiques. C'est notamment le cas lors d'une ischémie-reperfusion. Des travaux récents ont montré qu'un antagoniste de l'aldostérone a une action bénéfique en cas d'IRC. Nous faisons donc l'hypothèse qu'une inhibition de WNK1 pourrait avoir les mêmes effets bénéfiques.

WNK1 est aussi exprimé dans les glomérules et plus particulièrement dans les podocytes, des cellules qui n'existent que dans cette structure. Des études récentes ont montré (1) que l'entrée du calcium dans ces cellules est stimulée lors des maladies glomérulaires et (2) que l'inhibition de cette entrée de calcium a un effet bénéfique dans le cadre de ces maladies. WNK1 étant connu pour stimuler l'entrée du calcium dans les cellules, son inhibition pourrait là encore avoir un rôle protecteur lors des maladies glomérulaires.

Notre objectif est de caractériser le rôle joué par WNK1 lors d'une insuffisance rénale chronique provoquée par une IR ou une maladie glomérulaire. Nous avons choisi d'utiliser la souris comme modèle expérimental. En effet, comme nous l'avons mentionné ci-dessus, l'IRC est une maladie évolutive, avec une phase d'agression initiale aigue suivie d'une phase de réparation puis d'une phase de fibrose. De plus, l'IRC met en jeu plusieurs types cellulaires dont des cellules immunitaires qui proviennent d'autres organes que le rein. Il est donc très difficile voire impossible de modéliser ces interactions cellulaires et cette cinétique dans des modèles cellulaires ex vivo. Enfin, si plusieurs laboratoires travaillent sur le développement des organoïdes rénaux, les techniques actuelles ne permettent d'obtenir que des organoïdes représentatifs du rein fœtal et non adulte.

Notre laboratoire a établi plusieurs modèles de néphropathie expérimentale chez la souris. Nous appliquerons ces différentes pathologies à des modèles de souris génétiquement modifiées porteuses d'une inactivation de WNK1 spécifiquement dans les cellules où il pourrait jouer un rôle dans l'IRC, à savoir les cellules vasculaires et les podocytes. Nous utiliserons 990 souris. Ce nombre a été calculé de sorte à réduire au maximum l'utilisation des animaux afin de respecter la règle des "3 R".

Le bien-être des animaux est assuré au quotidien par un enrichissement de leur environnement grâce à l'utilisation d'une litière à base de cellulose composée de plusieurs éléments, de tailles différentes (matière compacte initialement, décompactée par les animaux) et de morceaux de bois à ronger. Les animaux sont observés quotidiennement. Si une agressivité est observée, des abris seront placés dans la cage. Pendant les procédures expérimentales, une surveillance quotidienne sera assurée par des mesures non invasives (pesée, examen de l'état général de l'animale). Nous aurons également recours à des analgésiques lorsque cela est nécessaire, notamment après chirurgie.

Nous espérons que notre projet nous permettra de mieux comprendre les mécanismes à l'origine de l'IRC et, ainsi, de développer de nouvelles méthodes préventives et/ou thérapeutiques.

15126 Le suivi sanitaire de colonies de primates non-humains repose sur des mesures prophylactiques et curatives. Dans le cadre de mesures prophylactiques, lors de contrôles sanitaires, différents actes sont réalisés dont potentiellement un examen échographique de l'abdomen afin de détecter de potentielles anomalies non symptomatiques. Dans le cadre de mesures curatives, il est courant d'associer un examen échographique à d'autres analyses (bilan sanguin, radiographie, endoscopie) afin d'exclure certaines étiologies et de poser un diagnostic.

La capacité de détection d'anomalies lors d'échographies abdominales repose à la fois sur une bonne connaissance de l'anatomie de l'espèce ainsi que sur la disponibilité de valeurs de référence concernant un certain nombre de paramètres tels que l'épaisseur des parois de certains organes (vessie, tube digestif, système vasculaire) et la taille de certains organes (reins, surrénales, noeuds lymphatiques, diamètre des veines et artères principales).

Il n'existe pas à ce jour d'atlas échographique précis de l'abdomen des primates non-humains, en particulier du babouin olive. Nous proposons donc dans le cadre de la réalisation d'une thèse d'exercice de médecine vétérinaire, d'échographier au maximum 50 individus babouins olives (*Papio anubis*). Il s'agit de détailler les techniques d'examen échographique utilisées chez le babouin olive, d'élaborer des valeurs de référence ainsi qu'un atlas échographique digitalisé.

L'examen échographique se réalise sous anesthésie générale, d'une durée maximale de deux heures. L'ensemble des organes et structures ciblés (différences d'échogénicité inter- et intra-organes, foie, vésicule biliaire, reins, surrénales, système digestif, vessie, noeuds lymphatiques, rate, système vasculaire) seront visualisés et mesurés par deux expérimentateurs. Ces deux expérimentateurs réaliseront les mesures pour l'ensemble des individus.

Les individus sont hébergés en groupes sociaux de 2 à 30 individus. Ils seront isolés de leur groupe au plus tôt la veille de l'examen, au plus tard le jour même. Ils seront réintégrés dans leur groupe d'origine le jour même de l'examen, une fois totalement réveillés de leur anesthésie. Le nombre d'individus impliqués dans l'étude est réduit au minimum nécessaire pour obtenir des valeurs de références fiables. Le remplacement du modèle animal babouin olive n'est pas possible du fait du sujet de l'étude nécessitant de travailler sur ce modèle animal.

15127 Notre organisme répond au stress en mobilisant des réserves énergétiques et en ajustant notre physiologie pour faire face à la situation. Les processus par lesquels le stress affecte notre cerveau se retrouvent à différents niveaux cellulaires, affectant ainsi nos réactions émotionnelles et comportementales. Le stress peut entraîner des changements inadaptés ou même pathologiques, qui semblent être liés aux changements dans la bioénergétique du cerveau. Récemment, il a été rapporté que le métabolisme cellulaire nécessaire pour alimenter l'activité des cellules du cerveau est régulé par les cannabinoïdes endogènes (endocannabinoïdes). Le but de ce projet est donc d'étudier si le système endocannabinoïde est impliqué dans les effets comportementaux du stress. Prenant en compte le rôle majeur de la sécrétion de corticostérone, l'hormone du stress, ce projet se focalisera également sur son rôle dans les interactions entre stress et endocannabinoïdes. A cette fin, nous souhaitons utiliser des souris mutantes pour le principal récepteur des endocannabinoïdes dans le cerveau, ces souris n'exprimant pas ce récepteur dans différentes organelles de la cellule, dans différentes populations cellulaires ou dans différentes régions du cerveau. Les résultats devraient nous aider à décrire comment (i) le système endocannabinoïde contrôle les effets du stress, ce contrôle ayant des répercussions sur (ii) les fonctions cognitives liées à la mémoire. Ce projet ouvrira alors la voie au développement de stratégies thérapeutiques efficaces pour les troubles mnésiques liés au stress.

D'un point de vue méthodologique, nous développerons ce projet en respectant le principe important des 3R (remplacer, réduire, raffiner). Ainsi, pour le R de remplacer pour comprendre les mécanismes complexes de la mémoire, qui dépendent du comportement actif du rongeur, nous ne pouvons malheureusement pas utiliser des méthodes alternatives plus simples (cultures cellulaires *in vitro*, modèles informatiques *in silico*) car celles-ci fournissent des informations trop limitées et ne peuvent reproduire toute la complexité d'un organisme vivant. Pour le R de réduire, en effectuant un petit nombre d'expériences pilotes au début de ce projet, nous pouvons réduire considérablement le nombre d'expériences ultérieures (et donc le nombre d'animaux) nécessaires pour tirer des conclusions au niveau des populations. Nous nous engageons à utiliser le nombre minimum d'animaux strictement nécessaire pour dégager une conclusion statistique solide à partir de cette population. La réalisation de l'ensemble de ce projet nécessite l'utilisation d'un maximum de 1528 souris sur une période de 5 ans. Ce nombre est justifié par l'utilisation de différentes approches comportementales et pharmacologiques dans plusieurs lignées de souris. Pour le R de raffiner, il est important de noter que pour diminuer les pertes après les interventions, nos animaux

sont surveillés quotidiennement afin de s'assurer que tout le bien-être requis est assuré. Aussi, si une procédure est susceptible de provoquer une douleur, les animaux seront traités avec un anesthésique et/ou un analgésique pour la réduire. Dans ce projet, les animaux seront toujours hébergés en groupe avec accès à un environnement enrichi (matériel de nidification).

15128 L'obésité, accompagnée de ses co-morbidités associées telles que le diabète de type 2 (DT2), la maladie du foie gras ou encore les maladies cardiovasculaires, favorise le développement de certains cancers (cancer du foie, du sein, du colon et de la prostate). Ces pathologies représentent un problème majeur de santé publique ainsi qu'une lourde charge socio-économique partout dans le monde. L'obésité, définie comme une accumulation excessive et délétère de graisse dans l'organisme, est une maladie multifactorielle qui peut être expliquée principalement par un déséquilibre entre les apports et les dépenses énergétiques, mais aussi par des origines génétiques, épigénétiques ou environnementales. Le DT2 est caractérisé par une résistance à l'action hypoglycémiant de l'insuline de ses tissus cibles et donc par une hyperglycémie. Les cellules B pancréatiques produisent de plus en plus d'insuline dans les premiers stades de la maladie (hyperinsulinémie) afin d'outrepasser cette résistance à l'insuline mais finissent par s'épuiser conduisant à une glycémie non régulée, à des complications graves à long terme et à une mort prématurée des patients.

Il n'existe que peu d'armes thérapeutiques dans l'arsenal médical actuel pour soulager/guérir de tels troubles métaboliques. Les traitements chirurgicaux de l'obésité (anneau, bypass gastrique) ne se pratiquent que dans des cas d'obésité morbide et ne sont pas sans risques. Les médicaments antidiabétiques regroupent plusieurs classes de molécules selon leurs mécanismes d'action mais la glycémie de certains patients reste mal contrôlée. Dans tous les cas, ces traitements doivent s'accompagner d'un changement de mode de vie alimentation équilibrée et activité physique régulière, ce qui n'est pas toujours suffisant ou simple à mettre en place.

Il est donc primordial de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour lutter contre l'obésité, les désordres métaboliques et le développement de certains cancers. Devant ces enjeux, nous développons des anticorps monoclonaux neutralisants à visée thérapeutique dans le domaine de l'obésité, des maladies métaboliques associées et du cancer. Le présent projet, basé sur des résultats *in vitro* prometteurs, se propose d'étudier l'impact de deux anticorps sur le métabolisme et plus particulièrement sur l'adiposité et les sensibilités à la leptine et à l'insuline.

Nous souhaitons étudier l'effet thérapeutique d'anticorps monoclonaux pour lutter contre l'obésité et le DT2. Nous disposons déjà de résultats *in vitro* prometteurs mais seul un modèle animal (organisme entier) permet de rendre compte de la complexité d'un modèle physiologique intégré, surtout dans le cas de maladies multifactorielles qui touchent différents organes comme les maladies métaboliques. Avant d'envisager une éventuelle thérapie basée sur nos anticorps chez l'homme, la preuve de leur efficacité et de leur innocuité ne peut être apportée que par des études pré-cliniques menées chez un animal proche évolutivement de l'humain.

Dans ce projet, la contrainte pour les animaux sera constituée par l'induction d'une obésité par un régime, puis par des tests de glycémie, test de sensibilité à l'insuline, composition corporelle et mesure des paramètres du métabolisme.

Dans un souci de réduction de l'utilisation d'animaux, plusieurs de ces analyses pourront être réalisées sur un même groupe de souris, dans le respect du bien-être animal et de la réduction/suppression de la douleur. Les résultats obtenus grâce à ces études *in vivo* pré-cliniques devraient permettre de valider nos cibles thérapeutiques et de développer de nouvelles thérapies pour lutter contre les maladies métaboliques chez l'homme. Ce projet de 5 ans nécessitera au maximum 489 souris.

Des points limites précis et précoces ont été définis et seront strictement appliqués afin de limiter la contrainte pour les animaux.

15129 La flore intestinale appelée aussi microbiote, est constituée chez l'Homme, entre autres, de plus de 1000 espèces bactériennes différentes qui représentent entre 1 et 2 kg. Cette abondance oblige

l'organisme à mettre en place des systèmes de défense. Parmi ceux-ci, on trouve les peptides antimicrobiens. Ce sont de petites molécules secrétées par les cellules intestinales qui possèdent une charge électrique positive. Les bactéries, quant à elles, arborent une charge de surface globalement négative. Les charges négatives et positives s'attirant, lorsqu'un peptide antimicrobien « rencontre » une bactérie, il s'y fixe, créant des pores dans la paroi bactérienne, tuant ainsi la bactérie. Il a été remarqué que certaines espèces bactériennes du microbiote intestinal possèdent des gènes qui coderaient pour des protéines capables de modifier la charge électrique de surface. Nous avons identifié notamment deux gènes candidats et vérifié *in vitro* qu'ils étaient impliqués dans la résistance aux peptides antimicrobiens secrétés par le tractus digestif. Notre hypothèse est que cette modification de la charge et la résistance accrue aux peptides antimicrobiens qui en découle, favoriserait ainsi leur implantation digestive. Nous souhaitons valider cette hypothèse en utilisant un modèle murin possédant un microbiote intestinal simplifié, contrôlé et sain. Ces animaux ont déjà permis une meilleure compréhension des mécanismes d'infection et de résistance mettant en jeu des pathogènes humains et ne seront soumis à aucun prélèvement invasif.

Les gènes candidats ont été clonés dans une souche d'*Escherichia coli* déjà rapportée comme colonisant très mal le tractus digestif de la souris. Nous testerons la capacité de ces souches à coloniser le tractus digestif en suivant notamment le nombre de ces bactéries dans les fèces des animaux. Sur la durée du protocole, nous utiliserons 45 souris. Chaque lot recevra par un gavage unique la souche d'*E. coli* possédant ou non un des gènes modifiant la charge de surface. Aucune méthode alternative n'existe car nous désirons étudier la capacité des souches bactériennes possédant les gènes candidats à coloniser efficacement le tractus digestif. Afin d'optimiser l'utilisation de chaque animal, un maximum d'échantillons sera prélevé puis analysé.

Des études *in vitro* menées en amont, ont permis de cribler des gènes candidats de manière à réduire le nombre de souris utilisées. Les animaux seront hébergés dans des cages standards avec un accès illimité à l'eau et à la nourriture et le milieu sera enrichi à l'aide de maisons en carton. Nous ne pensons pas que les manipulations proposées induisent un stress chez l'animal étant donné que la souche bactérienne utilisée n'est pas rapportée comme néfaste pour les souris et que les gènes candidats testés sont retrouvés dans les bactéries du microbiote intestinal normal. Cependant, un suivi quotidien des animaux sera effectué de manière à repérer toute détresse animale. Les animaux seront immédiatement mis à mort s'ils présentent un des critères suivant une perte de poids supérieure à 10% un dos voûté, un poil dru ou une démarche traduisant un mal-être du sang dans les fèces ou de la diarrhée. Pour faciliter le suivi des souris, un système de score intégrant différents paramètres (apparence, comportement, signes cliniques) sera utilisé de manière à nous assurer qu'aucun animal n'est en souffrance.

15130 L'allergie est une pathologie inflammatoire chronique qui a vu sa prévalence plus que doublé en 30 ans. Aujourd'hui l'allergie, au sens large, est classée en quatrième position en termes de morbidité par l'OMS. La prévalence de l'allergie alimentaire est de l'ordre de 2% chez les adultes et de 5% chez les enfants. PCSK9 est une proprotéine convertases, dont le rôle est de cliver les précurseurs de différentes protéines. Dans le foie, elle se fixe aux récepteurs du LDL-cholestérol et induit leur dégradation. Elle est également exprimée dans les entérocytes, où elle augmente l'absorption des triglycérides, et dans les cellules musculaires lisses des vaisseaux sanguins. Elle faciliterait de plus l'apoptose, et contribuerait au syndrome inflammatoire et à la réponse en cas de choc septique. Au-delà du rôle canonique de PCSK9 sur le LDL-R et la cholestérolémie, plusieurs études suggèrent une implication de PCSK9 dans l'inflammation. Récemment, un lien entre PCSK9 et le choc septique, qui se caractérise par une infection microbienne sévère, a été démontré par une série d'études indépendantes. En effet, l'inhibition génétique ou pharmacologique de PCSK9 est associée avec un meilleur pronostic au cours d'un choc septique chez la souris et chez l'homme. Lors de ce projet, nous proposons d'étudier l'impact de PCSK9 sur l'allergie alimentaire. Pour cela nous utiliserons un maximum de 300 souris rendu allergiques ou non par le protocole mis au point quelques années plus tôt au sein de notre laboratoire. Afin de respecter le bien-être animal, nous respecterons la règle des 3R en 1) raffinant les procédures grâce à la manipulation des souris uniquement par des techniciens expérimentés. De plus une surveillance des souris sera effectuée

au moins trois fois par semaine, l'aspect extérieur et le poids des souris seront particulièrement observées. Enfin les souris seront hébergées pas plus de cinq par cage ventilée, l'accès à la nourriture et à l'eau sera ad libitum. 2) réduisant le nombre de groupe d'animaux contrôles 3) le remplacement est malheureusement impossible lors de ces procédures. De plus des mesures de prise en charge de la contrainte seront réalisées incluant l'utilisation d'analgésique avant anesthésie, l'absence de baisse de température lors des anesthésies par l'utilisation de tapis chauffant, la surveillance quotidienne des animaux selon des points limites adaptées.

15131 Les coronavirus sont couramment associés à des infections respiratoires aiguës chez l'homme. De par leur capacité à infecter plusieurs espèces hôtes, ce sont des agents pathogéniques complexes et des sources communes de zoonose. Le coronavirus du Syndrome Respiratoire Aigu Sévère (SRAS-CoV) et le coronavirus du Syndrome Respiratoire du Moyen-Orient (MERS-CoV) sont des agents pathogéniques zoonotiques qui ont provoqué depuis le début du 21ème siècle des épidémies de maladies respiratoires graves chez l'homme.

Un nouveau coronavirus nommé « SARS-CoV-2 » a émergé en Décembre 2019, à Wuhan en Chine. Plusieurs dizaines de personnes infectées en sont déjà décédées en Chine, et des milliers de personnes infectées continuent de propager le virus à travers le monde. Le virus a été isolé et la séquence de son génome a été publiée. Des tests de diagnostic clinique du SARS-CoV-2 se mettent déjà en place, mais aucun vaccin n'est pour le moment disponible contre ce virus très virulent, agent étiologique de l'épidémie actuelle des syndromes respiratoires aigus chez l'homme.

Notre laboratoire utilise la technologie des vecteurs lentiviraux, une plateforme de vecteurs vaccinaux sous-unitaires, très efficace pour induire des réponses immunitaires adaptatives, de type humoral et/ou à médiation cellulaire. En nous basant sur les données de virus très similaires à SARS-CoV-2 comme le SRAS-CoV et le MERS-CoV, nous allons générer des candidats vaccins basés sur l'expression de protéines issues du virus SARS-CoV-2 par un vecteur lentiviral. La réponse immunitaire induite devrait permettre d'empêcher ou de limiter l'infection, ainsi que la progression vers le syndrome respiratoire aigu.

Avant de procéder aux expériences de protection vaccinale, nous déterminerons dans un premier temps les caractéristiques de l'infection et la sensibilité de la souris (chez deux lignées de souris de laboratoire Mus musculus, BALB/c et C57BL/6) et du hamster au SARS-CoV-2.

Dans un second temps, nous évaluerons l'immunogénicité d'une gamme de vecteurs vaccinaux chez la souris. Les vecteurs les plus immunogéniques seront choisis pour être évalués dans des expériences de protection contre l'infection par le SARS-CoV-2.

Nous évaluerons enfin l'effet prophylactique des vecteurs vaccinaux sélectionnés contre l'infection par le coronavirus SARS-CoV-2 chez : (i) l'une des deux lignées de souris BALB/c et C57BL/6, en fonction des réponses immunitaires induites par les vecteurs vaccinaux, (ii) le Hamster Doré Syrien (*Mesocricetus auratus*), qui constitue un modèle expérimental plus pertinent que le modèle murin car le hamster développe certains symptômes de la maladie respiratoire aiguë similaires à ceux observés chez l'homme. L'efficacité de la protection vaccinale sera jugée par l'analyse comparée, chez des animaux vaccinés et non vaccinés, de la charge virale (souris et hamster) et de l'histopathologie du poumons (hamster).

Nous avons construit ce projet dans le respect des règles de 3R, comme suit :

Remplacer : Aucun modèle *in vitro* ne permet à ce jour d'étudier la pathogenèse suite à l'infection par des coronavirus et la vaccination contre cette infection. La stratégie de « Remplacement » consiste ici à utiliser le modèle de souris ou de hamster, car ces espèces sont relativement résistantes à cette infection, ce qui nous permet de minimiser la souffrance animale, tout en évitant l'utilisation des animaux de plus grande taille et de plus grande sensibilité.

Réduire : Pour calculer la taille des groupes d'animaux injectés par les vecteurs lentiviraux à tester, nous avons utilisé les données statistiques types de nos expériences antérieures. Pour les expériences d'infection sur lesquelles nous avons moins de recul, nous avons planifié d'inclure le nombre minimal d'individus par groupe expérimental qui permettra une analyse statistique pertinente et concluante basée sur des tests statistiques appropriés, recommandés par un expert

en bio-statistiques. Le nombre estimé d'animaux utilisés dans ce projet est de 760 souris et 272 hamsters, inclus dans 6 procédures expérimentales dont 2 de classe légère et 4 de classe modérée. Raffiner : Lors des expériences chez les souris ou les hamsters infectés par le coronavirus SARS-CoV-2, une surveillance quotidienne sera mise en place à partir du jour 1 après l'épreuve par le virus. Tout en respectant les conditions qui permettent au projet de recherche d'atteindre ses objectifs, des points limites sont définis afin d'éviter toute souffrance animale. Les expériences ne nécessitent aucune médication et seront réalisées par des expérimentateurs formés. Aucun dommage pour les animaux n'est donc attendu, cependant si des signes cliniques sont observés lors de la surveillance, les animaux seront mis à mort.

15132 Les études prospectives montrent que l'augmentation combinée de la population mondiale et du niveau de vie dans les pays émergents va rapidement et largement accroître la demande en protéines alimentaires. Cette demande ne pourra pas être complètement satisfaite, de façon durable, par une augmentation des productions animales. Il est donc urgent de trouver des sources alternatives de protéines pour l'alimentation humaine. D'autre part, la souveraineté alimentaire demeure une préoccupation majeure dans de nombreuses régions tropicales. Dans ces régions, la culture de nombreuses variétés de légumineuses est possible et souhaitable d'un point de vue agroécologique. Elle pourrait soit subvenir directement aux besoins protéiques en nutrition humaine, soit contribuer à l'alimentation du bétail pour la production de protéines animales. Les légumineuses constituant une source de protéines importante, un compromis reste à définir en fonction de leurs propriétés, en particulier en fonction de leur digestibilité pour l'Homme, pour leur utilisation en nutrition humaine ou en nutrition animale. Un équilibre entre production de protéines végétales et animales pourrait ainsi être établi à l'échelle de l'exploitation.

L'objectif du projet Protein 3 est d'évaluer le potentiel nutritionnel de différentes variétés de légumineuses guadeloupéennes sur la base de la caractérisation de leurs protéines. Nous effectuerons des mesures de leur composition en acides aminés, de leur digestibilité et de leur vitesse de digestion, en prenant en compte la présence de facteurs antinutritionnels (inhibiteur de la protéolyse digestive).

L'index de référence pour mesurer la qualité nutritionnelle d'une protéine alimentaire est le DIAAS (pour 'Digestible Indispensable Amino Acid Score') proposé par la FAO (2013). Il repose sur la composition en acides aminés indispensables (AAI) de la protéine, par rapport à celle d'une protéine de référence permettant de couvrir les besoins de l'homme pour chacun des AAI, et la biodisponibilité de chacun des AAI. La biodisponibilité des acides aminés composant les protéines alimentaires est généralement évaluée par une mesure de la quantité d'acides aminés absorbés avant la fin de l'intestin grêle (digestibilité iléale réelle). Au-delà de la composition en AAI, cette mesure de digestibilité est indispensable pour pouvoir classer les protéines alimentaires les unes par rapport aux autres, et ajuster les apports alimentaires aux besoins. Un autre critère qui peut être intéressant à considérer, notamment pour la nutrition de populations spécifiques telles que les personnes âgées, est la vitesse de digestion des protéines. En effet il a été clairement démontré que la vitesse de digestion d'une protéine peut très significativement affecter l'utilisation métabolique des acides aminés qui la composent.

Le projet nécessite le recours à la chirurgie sous anesthésie générale sur des miniporcs (implantation d'une canule iléale et de cathéters vasculaires afin d'effectuer les prélèvements). Pendant les phases péri et post opératoires, un protocole sera mis en place pour prévenir d'éventuels processus douloureux ainsi qu'un suivi régulier par du personnel qualifié afin de garantir au mieux le bien-être des animaux.

Le projet répond à la règle des 3R. Il n'existe pas de méthode *in vitro* validée par la communauté scientifique internationale pour prédire la digestibilité des protéines alimentaires dans l'intestin grêle de l'homme (impossible de Remplacer). Celle-ci étant très difficile à mesurer directement chez l'homme, le recours au modèle animal porcin (le plus près de l'homme en terme de physiologie digestive) est la meilleure alternative (FAO 2013). Au maximum, 8 miniporcs seront utilisés dans le projet. L'effectif a inclure dans l'étude (n=6) a été calculé pour obtenir une précision de +/- 0,5% sur la valeur de digestibilité mesurée. La méthodologie utilisée pour mesurer cette digestibilité est

totallement maîtrisée par les investigateurs qui possèdent une expertise reconnue dans le domaine (Raffiner). Les 6 animaux recevront successivement, dans un ordre aléatoire, les 6 fractions protéiques à tester, ce qui permet de limiter le nombre d'animaux utilisés (Réduire).

15133 L'absence d'une protéine de la matrice extracellulaire, la substance entourant les cellules des tissus, est responsable d'un groupe hétérogène de maladies neuromusculaires. Nous avons reproduit dans la souris une mutation identifiée chez un patient présentant cette forme de myopathie. Les animaux homozygotes sont viables, fertiles, et ont une durée de vie normale. Ils développent une faiblesse progressive des muscles squelettiques. Ce modèle est donc adapté pour l'évaluation d'approches thérapeutiques. A l'heure actuelle, les seules pistes thérapeutiques étudiées visent à corriger les défauts secondaires et sont donc non-spécifiques. L'objectif de projet est de tester une approche de thérapie génique permettant de ré-exprimer dans le tissu d'intérêt la protéine déficiente. Le projet fait suite à une étude pilote approuvée précédemment et dont les résultats sont satisfaisants. Le projet sera mené en deux phases 1) des injections intramusculaires dans la loge antérieure des pattes arrières de souriceaux (3-4 jours) seront réalisées et des analyses fonctionnelles et histologiques, immunohistochimiques, biochimiques (donc post-sacrifice) seront réalisées 1, 2, 3 et 6 mois après injection 2) si les résultats obtenus dans la 1ère partie sont concluants, des injections seront réalisées dans la veine mandibulaire de souriceaux et les mêmes analyses seront menées 1, 2, 3 et 6 mois plus tard. Le projet sera réalisé dans le respect de la règle des 3Rs. Nous ne pouvons réaliser ces tests dans un autre système que le modèle animal (principe de remplacement) car le muscle est un tissu complexe et les modèles *in vitro* ne reproduisent pas sa complexité de plus la validation de l'approche thérapeutique nécessite des études fonctionnelles que seul un modèle animal permet de réaliser. Les résultats de la 1ère partie du projet conditionneront la mise en place de la 2nde partie ce qui permettra éventuellement d'utiliser moins d'animaux s'ils n'étaient pas assez probants. A différentes étapes du projet, en fonction des résultats obtenus nous évaluerons la pertinence de poursuivre ce qui pourrait nous amener à utiliser moins d'animaux que prévus (principe de réduction). De plus, des études fonctionnelles non invasives (mesures de mobilité et force musculaire) seront réalisées de façon longitudinale sur les mêmes animaux à différents temps post-injection. Les conditions d'hébergement et les procédures seront réalisées dans les meilleures conditions (principe de raffinement) avec une surveillance journalière des animaux et un hébergement en zone adaptée au type de vecteur viral testé. Lorsque les procédures le nécessitent, les animaux seront anesthésiés. Une grille de points limites sera établie et permettra de vérifier que la procédure n'a pas entraîné d'effets délétères notamment sur la locomotion des animaux, ni leur capacité à se nourrir.

Le projet comportera 3 procédures 1) injection du vecteur viral par voie intramusculaire ou intra-veineuse sur des animaux de 3 à 4 jours 2) analyses fonctionnelles non invasives 3) mesure terminale de force *in situ* et sacrifice pour prélèvement de tissus et organes.

Au total 76 animaux seront injectés en intra-musculaire et 140 en intra-veineux, ce qui donne un total de 216 animaux.

15134 La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est la première cause de malvoyance après 50 ans et on estime à un million le nombre de personnes concernées. A ce jour, la cause précise de la maladie est encore inconnue, mais plusieurs hypothèses concernant le développement de la pathologie ont été proposées, et notamment le rôle très probable de la toxicité lumineuse et du stress oxydant sur la mort des cellules de la rétine.

Le but de ce projet est de valider l'effet protecteur de substances naturelles à fort potentiel anti-oxydant, sélectionnées à partir de tests réalisés sur un modèle cellulaire de phototoxicité rétinienne, dans un modèle murin de phototoxicité rétinienne induite. Le développement d'un complément alimentaire et/ou d'un médicament visant à traiter la DMLA chez l'homme pourrait découler de ces expériences.

Un total de 1200 souris sera utilisé pour réaliser ces expériences sur une durée totale de 5 ans, ce qui représente une moyenne de 240 souris par an.

La règle des 3R sera appliquée. Remplacer Ce projet fait suite à plusieurs tests sur cellules démontrant sans conteste le potentiel des molécules d'intérêt en thérapie humaine. La validation des effets thérapeutiques chez l'animal est donc à ce stade indispensable pour envisager un développement thérapeutique. Réduire Nous réduirons au minimum le nombre de souris par groupe afin de pouvoir réaliser un test statistique. Raffiner Une surveillance sera réalisée par le manipulateur pendant la durée de la chirurgie, lors du réveil et le lendemain matin. Les souris seront ensuite observées quotidiennement par l'animalier et/ou le manipulateur. Toutes les manipulations le nécessitant seront réalisées sous anesthésie générale et/ou locale et des traitements préventifs (antibiotique, anti-inflammatoire) seront utilisés afin de réduire les risques d'infection et de douleur. Le poids et l'apparence physique des souris seront vérifiés tout au long des procédures expérimentales. Une perte de poids très importante ou un signe révélateur de souffrances engendrera une euthanasie. Le comportement et la posture des souris seront également observés afin d'évaluer le degré de bien-être ou de douleur.

15135 Le consensus général concernant les troubles neuro développementaux (e.g. troubles du spectre autistique TSA), est qu'ils proviennent de défauts de développement précoces dans la formation du cerveau. Ceci entraînant une modification des circuits neuronaux responsables du comportement pathologique.

La prématurité est souvent liée à la survenue d'une période d'hypoxie associée ou non à une période d'inflammation. Les nouveau-nés prématurés courent un risque plus élevé que les nourrissons nés à terme de développer des troubles neuro développementaux. Par exemple, ils courent un risque dix fois plus élevé de développer des symptômes analogues aux TSA.

Les modèles murins de prématurité utilisés actuellement en recherche reproduisent l'une ou l'autre de ces atteintes, i.e. hypoxie ou inflammation, qui sont donc étudiées de façon indépendantes. Le modèle d'hypoxie chronique consiste à placer les souriceaux nouveau-nés avec leur mère dans une chambre d'hypoxie à 10% d'oxygène. Il vise à reproduire l'hypoxie associée à une immaturité des poumons et/ou aux apnées chroniques fréquemment observés chez les grands prématurés. Le modèle d'injection de molécules pro inflammatoires vise à reproduire les inflammations systémiques et centrales détectées chez certains grands prématurés.

Il est probable que ces deux atteintes aient un effet additif sur les lésions cérébrales diffuses fréquemment observées chez les grands prématurés. Pourtant, aucun modèle murin actuel ne permet de les combiner.

Dans ce projet de recherche fondamentale, nous proposons d'effectuer des expériences pilotes nécessaires à la mise en place d'un tel modèle. L'espèce animale retenue pour ce projet est la souris, espèce actuellement utilisée dans les deux modèles murins mentionnés ci-dessus. Nous estimons qu'un nombre total de 48 souris (8 femelles et 40 souriceaux) sera nécessaire pour accomplir cette étude-pilote d'une durée de 1 an. Tous les animaux seront euthanasiés après exposition à la procédure 1, afin de récupérer les tissus et effectuer une analyse histologique poussée du volume cortical ainsi que des conséquences de l'hypoxie combinée ou non à l'inflammation sur l'apparition de lésions diffuses des substances blanches et grises par marquages immunohistochimiques.

Procédure de ce projet (Classe modérée) : Après leur naissance, nous exposerons la moitié des souriceaux à une période d'hypoxie de 8 jours (réduction de la concentration d'oxygène à 10% du 3e au 11e jour postnatal, correspondant à une altitude d'environ 4500 mètres), l'autre moitié étant hébergée dans des conditions normoxiques. Dans ces deux groupes, la moitié des souriceaux recevra une injection d'un lipopeptide bactérien à 8 jours. Les animaux seront ensuite euthanasiés immédiatement après la période hypoxique (11e jour postnatal). Ceci nous permettra d'étudier l'impact immédiat d'une hypoxie et où d'une inflammation sur l'intégrité du tissu cérébral.

Application des 3Rs

Remplacement L'analyse *in vivo* reste incontournable pour ce projet de recherche. En effet, les séquelles neurologiques post-hypoxiques/inflammation dépendent de mécanismes complexes impossibles à reproduire *in vitro* d'où la nécessité d'un modèle animal pour étudier la pathologie.

Réduction La méthode d'échantillonnage utilisée permettra non seulement un échantillonnage homogène de notre région d'intérêt, mais aussi l'utilisation des mêmes cerveaux pour des marquages immunohistochimiques variés, nous permettant de minimiser le nombre d'animaux nécessaire à ce projet. Enfin, nous avons mis en place dans l'équipe depuis plusieurs années un système de préservation de toutes les séries de coupes non utilisées. Cette banque de tissu permet d'optimiser sur le long terme l'utilisation du tissu tout en réduisant le nombre d'animaux utilisés.

Raffinement : Un suivi journalier (deux fois par jour pour la première expérience) des souriceaux sera effectué afin de détecter et traiter immédiatement tout signe d'inconfort des animaux. Les femelles seront échangées tous les 2 jours entre les cages normoxiques et hypoxiques, afin de préserver la quantité et la qualité du lait qu'elles produisent pour nourrir leurs souriceaux, et de minimiser au maximum le stress conséquent à la procédure sur les animaux.

15136 L'objectif de ce projet est de fournir aux acteurs de la recherche préclinique (recherche médicale, mise au point de médicaments, etc...) un outil de monitoring des variations de pression intracardiaque totalement non-invasif, utilisable chez le petit animal. Ce dispositif permettra à terme le monitoring cardiaque d'un animal totalement libre de ses mouvements, avec la seule contrainte de la présence d'un vêtement.

Cette expérimentation nous permettra d'une part d'apporter la preuve de concept de la mesure de variables caractéristiques de la fonction cardiocirculatoire sur un rongeur de laboratoire par une technique totalement non invasive, et d'autre part de valider la pertinence scientifique de ces variables par leur comparaison avec la technique invasive reconnue actuellement comme gold standard (cathétérisme cardiaque) dans le secteur préclinique.

L'ensemble des expérimentations sera réalisé dans le respect de la règle des 3 R remplacer, réduire et raffiner. Avec comme objectif la mise au point d'un dispositif d'investigation physiologique destiné à remplacer des technologies invasives actuelles et de permettre de réduire la souffrance animale et le nombre d'animaux inclus dans les protocoles de recherche préclinique. Nous avons testé le dispositif sur un banc d'essai, c'est à dire en le positionnant sur un simulateur mécanique. Cette étape nous a permis de démontrer la faisabilité de la mesure attendue. Cependant cette démonstration reste théorique car elle a été réalisée dans des conditions non contextualisées. Il faut maintenant démontrer que le dispositif est également fonctionnel en conditions d'usage et que la mesure est possible sur un animal vivant (conditions de bruit, artefacts de mouvements, etc). Le nombre d'animaux (20 rats Wistar) a été réduit au maximum afin d'obtenir des résultats statistiquement interprétables en couvrant l'ensemble des objectifs. Les animaux seront hébergés dans des cages avec enrichissement du milieu de vie pendant la période d'acclimatation. L'ensemble des procédures mises en œuvre sera réalisé sous anesthésie générale, et se terminera par la mise à mort de l'animal (procédure sans réveil).

15137 Les vaccins sont nécessaires pour prévenir ou traiter de nombreuses maladies infectieuses. De nouvelles approches sont ainsi développées contre des agents infectieux contre lesquels aucun vaccin suffisamment efficace n'existe à l'heure actuelle (ex VIH, Ebola, Zika...). Celles-ci permettraient également d'améliorer l'efficacité et l'innocuité des vaccins existants.

Les études sur des modèles animaux sont essentielles pour comprendre les mécanismes immunitaires induits par la vaccination qui peuvent être mis à profit pour le développement de nouvelles stratégies de prévention. La complexité du système immunitaire, impliquant différents effecteurs très hétérogènes et distribués au sein de différents tissus de l'organisme ne peut être que très partiellement reproduite dans les modèles *in vitro* et *ex vivo*. A titre d'exemple, l'analyse de la diffusion du vaccin dans l'organisme (appelé « biodistribution ») et de ses conséquences sur son innocuité et sur la qualité de la mémoire immunitaire à moyen et long terme ne peut s'envisager que *in vivo*, c'est-à-dire sur un organisme vivant.

Pour étudier la diffusion de molécules dans l'organisme de la manière la moins invasive possible, nous développons dans notre unité des techniques d'imagerie *in vivo* combinant l'analyse en microscopie de pointe et la visualisation des composantes des vaccins et des effecteurs de

l'immunité à l'échelle du corps entier (IRM et tomographie par émission de positons couplée à un scanner à rayons X ou TEP-CT). Certaines de ces technologies, comme celles basées sur l'utilisation de la TEP-CT, pourraient être transférées à court terme à l'imagerie de ces paramètres chez l'humain.

Grâce à ces techniques, les mécanismes d'action et l'innocuité des candidats vaccins sera mieux caractérisée avant de les tester chez l'humain.

Notre projet a pour objectif d'évaluer chez des modèles primates non humains (PNHs) les interactions entre les composantes du vaccin et les cellules de l'organisme hôte par imagerie *in vivo*. Ces vaccins auront montré au préalable leur intérêt dans des modèles *in vitro* et chez le modèle rongeur. Le PNH est cependant le seul modèle animal présentant une anatomie, une physiologie et une organisation du système immunitaire proches de celles de l'humain.

Les études que nous réaliserons permettront d'évaluer de nouveaux candidats vaccins pour l'humain et de nouvelles méthodes d'administration des vaccins. Sur 5 ans, il est prévu d'inclure dans cette étude 45 PNH au maximum par an. Ainsi, une trentaine de candidats vaccins pourront être évalués. Ce nombre prend en compte les différents scénarios du projet mais tout sera fait pour limiter les groupes expérimentaux nécessaires il est donc possible que moins d'animaux soient utilisés.

Ces animaux sont nés et élevés à des fins scientifiques dans des établissements éleveurs reconnus. Les méthodes expérimentales ont été conçues pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux

- 1) Imagerie *in vivo* peu invasive,
- 2) prélèvements de sang, de fluides muqueux, biopsies et imagerie réalisés sous anesthésie générale,
- 3) volumes de sang prélevés réduits au minimum nécessaire pour obtenir des résultats fiables sans affecter le bien-être des animaux,
- 4) critères d'arrêt prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets secondaires inattendus. Dans ce cas, le vétérinaire de l'installation sera sollicité afin de mettre en œuvre les traitements appropriés,
- 5) hébergement en groupe permettant des interactions sociales en permanence,
- 6) enrichissements (jouets, friandises, fruits, légumes, dispositifs périssables...) variés selon le programme d'enrichissement défini par la structure de bien-être animal de l'établissement.

15138 Il existe un intérêt grandissant sur l'effet des changements globaux sur la transmission des maladies infectieuses. En effet, aussi bien les changements environnementaux (réchauffement climatique) qu'anthropiques (flux de personnes) sont susceptibles de promouvoir l'émergence ou l'expansion des agents pathogènes. Dans ce contexte, les maladies tropicales sont supposées monter en latitude. Jusqu'en 2013, la Bilharziose urogénitale était restreinte aux zones tropicales et subtropicales de la planète. En été 2013, plus de 100 personnes ont contracté une Bilharziose autochtone dans le sud de la Corse. La Corse est une île méditerranéenne française, qui attire tous les étés des centaines de milliers de touristes. En été 2015 puis 2016 la contamination a repris et la Bilharziose est rentrée dans la liste des maladies infectieuses à déclaration obligatoire. La caractérisation génomique du parasite incriminé a montré qu'il ne s'agissait pas de l'agent pathogène habituel de la bilharziose uro-génitale humaine (*Schistosoma haematobium*) mais d'un parasite hybride entre cette espèce et un parasite de l'animal (*S. bovis*). Le statut hybride du parasite rend la situation épidémiologique plus complexe. En effet, le parasite hybride (i) pourrait être plus virulent pour ses hôtes invertébrés et vertébrés (i.e. vigueur hybride) (ii) est susceptible d'élargir son spectre d'hôtes invertébrés et vertébrés (iii) pourrait être moins sensible aux traitements médicamenteux (iv) et rendre plus difficile le diagnostic médical. Le projet est basé sur un protocole d'évolution expérimentale qui consiste à créer des souches hybrides de schistosomes dont le fonds génétique est contrôlé. Pour ceci, nous proposons d'hybrider les deux espèces pures de parasites à l'aide de croisements réciproques puis d'établir des souches rétro-croisées avec soit

l'espèce *S. haematobium*, soit l'espèce *S. bovis*. En fonction du niveau de rétro-croisement de chacune des deux espèces nous proposons (I) de tester la capacité des parasites hybrides à élargir leur spectre d'hôtes vertébrés (II) d'étudier les conséquences en termes de diagnostic médical en ce qui concerne l'examen parasitologique des fèces et des urines, le diagnostic ADN sérique ou antigénique (III) de retourner sur le terrain afin de comparer les résultats expérimentaux aux données recueillis en population naturelle.

Afin de pouvoir étudier les conséquences de cette hybridation sur la capacité invasive, le pouvoir pathogène et le pouvoir antigénique de ces parasites chez les ruminants, 45 ovins au maximum seront inclus dans les protocoles sur la durée du projet. Trois générations d'hybrides, soit 11 hybrides différents, seront étudiés et comparés à la capacité invasive et au pouvoir pathogène de la souche parentale de *S. bovis*.

Les expérimentations seront réalisées dans le respect de la règle des « 3R » (ensemble de recommandations concernant les moyens à mettre en œuvre pour limiter l'utilisation des animaux Remplacer, Réduire et Raffiner). Remplacer, les modèles *in vitro* ne permettent pas de modéliser la capacité invasive, le pouvoir pathogène et le pouvoir antigénique de ces parasites chez un organisme entier, l'utilisation d'un modèle ruminant, cible potentielle de ces parasites, est nécessaire. Réduire, les expérimentations seront conduites en regroupant au maximum les expérimentations pour diminuer le nombre de témoins non infestés (un ovin témoin par période d'expérimentation).

L'expérimentation sera réalisée, si possible, en seulement trois périodes différentes correspondant aux trois générations de croisement et rétro-croisements. Le nombre d'animaux infestés sera le plus faible possible, 3 animaux par hybride, tout en permettant l'obtention de résultats interprétables. Raffiner, les animaux seront par lot dans des pièces dédiées et mis en liberté avec jeux, nourriture et eau à disposition. Les animaux seront euthanasiés 16 semaines après l'infestation ce qui correspond au début de la période où les œufs peuvent commencer à être pondus par le parasite et excrétés par les animaux dans leurs urines ou leurs fèces en fonction de l'espèce/hybride de schistosome. Seule, l'accumulation des œufs du parasite dans l'hôte avec la réponse inflammatoire de l'hôte que cet amas provoque sont à l'origine des signes cliniques de cette maladie chronique. Les animaux seront donc euthanasiés au tout début de la maladie et les signes cliniques, s'ils sont présents, seront de très faible intensité permettant de minimiser au maximum la souffrance des animaux.

Ce projet se situe dans le contexte One Health ("une seule santé"), l'objectif finalisé est d'évaluer les risques et de délivrer des outils et des stratégies de contrôle pour lutter contre la transmission des maladies infectieuses dans un monde en perpétuel changement.

15139 L'Organisation mondiale de la santé estime que 285 millions de personnes dans le monde souffrent d'une déficience visuelle 39 millions de personnes sont aveugles et 246 millions son malvoyantes. En particulier, la cécité peut résulter soit d'une dégénérescence de photorécepteurs soit de la mort des cellules ganglionnaires rétiniennes qui sont chargées d'envoyer l'information visuelle au cerveau.

Même s'il est vrai qu'il existe des solutions telles que les prothèses rétiniennes ou la thérapie optogénétique qui donnent grand espoir pour la restauration de la vision des patients aveugles en raison d'une dégénérescence de photorécepteurs, aucune stratégie envisageable n'a émergé pour les patients qui ont perdu les cellules ganglionnaires rétiniennes et donc le lien œil cerveau, ou ceux qui souffrent d'une opacification cornéenne empêchant la lumière et l'image d'atteindre la rétine.

Le but du projet est, dès lors, d'étudier la faisabilité de restaurer la perception visuelle en stimulant le système visuel avec les ultrasons car ces derniers peuvent se propager dans des milieux opaques aux photons et ainsi de surmonter certaines limites de méthodes proposées antérieurement. Il a également été démontré que les ultrasons, déjà largement utilisés comme technique d'imagerie non invasive, peuvent dans certains cas stimuler l'activité des cellules neuronales.

Notre objectif est donc d'étudier si la stimulation par ultrasons, qui est non invasive et de haute résolution spatiale, peut procurer une stratégie prometteuse de restauration visuelle pour activer de façon sélective dans l'espace et le temps les neurones du système visuel.

Pour les différents protocoles expérimentaux, nous utiliserons au maximum 697 rats. Nous avons recours à ce modèle animal car il nous faudra valider les approches techniques sur le système visuel dans son intégrité de l'œil jusqu'au cerveau.

Nous prendrons soin de considérer la règle des 3R pour le bien-être des animaux.

Remplacer Nous avons recours à ce modèle animal car il nous faudra valider les approches techniques sur le système visuel dans son intégrité de l'œil jusqu'au cerveau. Il nous est malheureusement impossible de remplacer l'animal car nous avons besoin d'un système biologique intégré de l'œil jusqu'au cerveau.

Réduire Nous utiliserons le nombre de rats minimum, mais nécessaires pour obtenir des résultats statistiques. Le nombre d'animaux prévu sera réduit en essayant de réutiliser un même animal sur différents jours d'expérimentation.

Raffiner Les animaux sont hébergés dans les conditions conformes à la réglementation. Les rongeurs bénéficieront d'une anesthésie générale (fixe ou gazeuse pour les différentes procédures expérimentales et d'une anesthésie cornéenne lors des injections intraoculaires

15140 L'objectif de ce projet est d'identifier des composés chimiques ou biologiques qui pourraient être développés comme nouveaux médicaments dans le traitement de l'inflammation du colon, maladie qui regroupe différentes pathologies comme la colite ulcéreuse, la rectocolite hémorragique et la maladie de Crohn. Actuellement, l'arsenal thérapeutique disponible, notamment les anti-inflammatoires, ne permet pas de soigner correctement ces pathologies lourdes, et de multiples interventions chirurgicales sont nécessaires pour retirer au fur et à mesure les portions lésées de l'intestin. Malgré leur efficacité, les anti-TNF doivent être utilisés avec précaution dans ces pathologies car ils augmentent la survenue de maladies infectieuses. Il existe clairement un besoin thérapeutique pour soigner les colites inflammatoires.

Pour réaliser ce projet, un travail important est réalisé au préalable *in vitro* sur des cellules humaines, ceci dans le but de sélectionner les meilleures molécules à progresser. Cependant, étant donnée la complexité des mécanismes impliqués dans les pathologies inflammatoires du colon, il est difficile de prédire le potentiel thérapeutique d'une molécule uniquement sur la base de résultats *in vitro*. Il est donc nécessaire d'utiliser un modèle animal qui reproduit les différents aspects de ces maladies, afin de pouvoir évaluer *in vivo* les meilleurs composés identifiés.

Afin de déclencher les symptômes de la colite, différentes approches sont envisageables, en fonction du degré d'inflammation recherché dans l'intestin, du mécanisme d'action des composés à évaluer, et le besoin d'un modèle aigu ou chronique de la maladie

- Des souris ou rats peuvent être exposés à des composés chimiques ou des entités biologiques (anticorps ou bactéries) qui vont provoquer une inflammation du colon. Par exemple, des souris RAG1 ou RAG2 immuno-déficientes, ne possédant pas de lymphocytes B et T matures, peuvent déclencher une colite aiguë après injection d'un anticorps activateur de la voie CD40.

- De la même manière, des souris RAG1 ou RAG2 déficientes peuvent développer en quelques semaines une colite chronique après injection de cellules immunitaires humaines ou murines.

Les signes cliniques attendus sont modérés (diarrhée avec présence de sang dans les selles), comme chez les patients.

Les composés chimiques ou biologiques à évaluer dans ces modèles pourront être administrés par toute voie/fréquence possible.

Une observation quotidienne des animaux sera réalisée afin de noter tout signe clinique anormal, et un avis vétérinaire sera demandé en cas de doute. En cas de signes cliniques de souffrance au-delà de ceux attendus, des points limites seront mis en œuvre.

Une analyse bio-statistique des données générées dans ce modèle rongeur sera réalisée, afin d'inclure le minimum requis d'animaux par groupe pour obtenir une réduction significative de l'inflammation du colon.

Ce projet nécessitera une utilisation moyenne de 1600 souris et de 400 rats par an, soit 10000 animaux au total pour la durée totale du projet sur 5 ans.

15141 La capacité d'adaptation est une caractéristique qui a été dégradée, chez les animaux de rente, par la sélection pour des niveaux de production élevés. Ce qui a eu des conséquences négatives sur la santé, la reproduction, et la longévité de ces animaux et par conséquent a impacté l'efficacité de production. Les causes du déclin de la capacité d'adaptation sont majoritairement inconnues. La capacité d'adaptation d'un animal est due à des mécanismes adaptatifs opérant à différents niveaux d'organisation physiologique. Ils sont en partie sous le contrôle des conditions d'élevage et de nutrition, du statut physiologique de l'animal, mais aussi de son patrimoine génétique. Nous savons en particulier que la longévité fonctionnelle, qui traduit des mécanismes d'adaptation des adultes, est partiellement contrôlé par la génétique.

Ce projet s'inscrit dans le cadre d'un projet plus global dont l'objectif est de mieux comprendre le rôle de la génétique sur les capacités d'adaptation des chèvres adultes. Dans le cadre de ce projet, nous produisons et utilisons 240 chèvres laitières de race Alpine, issues d'une sélection divergente sur le caractère de longévité fonctionnelle (120 chèvres par lignée). L'ensemble des chèvres est génotypé et caractérisé sur des caractères de croissance, de métabolisme énergétique, de production de lait, de santé et de réponse à des challenges nutritionnels (2 diètes de 48h en première lactation) afin de mieux comprendre les déterminants de la capacité d'adaptation des chèvres à une épreuve transitoire nutritionnelle.

Dans cet avenant, nous proposons de réaliser une épreuve inflammatoire transitoire sur un sous ensemble des 80 chèvres de ce dispositif afin d'élargir le concept d'adaptation à la réponse anti-infectieuse, en relation avec le génotype longévité. En effet, la santé des animaux d'élevage fait partie intégrante de leur capacité d'adaptation et de leur bien-être. Les mammites, en particulier, représentent la maladie infectieuse majeure chez les ruminants laitiers. Pour ce faire, nous proposons une épreuve inflammatoire par voie générale à base de lipopolysaccharides (LPS), permettant de mimer une inflammation de type mammitaire. Ce challenge (procédure modérée), tel que proposé sur le caprin (Autor. APAFiS #20629 Relevé de température automatisé pour le suivi du bien-être en caprin), provoque une augmentation de la température corporelle transitoire (+1.9 C° entre +3 et +6 heures après l'épreuve) et qui rétrocede rapidement (en moins de 24 heures). Pour cela, nous préleverons du sang (procédure classe légère) à 11 reprises avant et après le challenge LPS (sur une durée de 4 jours). Le relevé de température automatisé pour le suivi du bien-être des chèvres et de leur réaction inflammatoire sera réalisé grâce à la pose d'un implant sous cutané (procédure légère).

Remplacement nous souhaitons réaliser une évaluation globale de la réponse anti inflammatoire de l'animal (immunité, clinique, production laitière, métabolisme énergétique), qui ne peut être étudiée qu'*in vivo*.

Réduction le nombre d'individus a été défini afin de pouvoir évaluer la réponse à l'épreuve inflammatoire en interaction avec le génotype de la chèvre.

Raffinement les chèvres seront hébergées en groupe, sur litière paillée. L'utilisation d'un composé non infectieux pour le déclenchement de l'inflammation réduit l'intensité de l'inflammation et permet de mimer les premières étapes d'une vraie infection. Les prises de sang réalisées ne nécessitent qu'une contention minimale, les animaux étant habitués à être manipulés. Les chèvres feront l'objet d'une surveillance accrue pendant toute la durée du protocole. La mise en place des implants sous cutané pour le suivi de la température sera réalisée par des opérateurs expérimentés et habilités (animaliers), qui côtoient ces animaux quotidiennement. Un baume décongestionnant, antiseptique et cicatrisant (Vetebiol®, baume végétal) sera appliqué en massage sur la zone concernée après mise en place de l'implant. Ces implants permettent donc de relever automatiquement la température et de supprimer les prises de température par voie transrectale.

15142 Les troubles de la vision sont un problème de santé publique touchant un grand nombre de personnes. Selon l'OMS, en 2002, plus de 161 millions de personnes étaient atteintes de déficiences visuelles dont 15.5 millions de personnes en Europe et plus particulièrement les personnes âgées de plus de 50 ans. Avec le vieillissement de la population, le nombre de personnes atteintes de déficiences visuelles/cécité augmente. En Europe, ces déficiences visuelles sont principalement dues à des rétinopathies pigmentaires et à la DMLA (dégénérescence maculaire liée à l'âge). Dans ces pathologies, ce sont les photorécepteurs de la rétine qui sont affectés par une dégénérescence. Depuis de nombreuses années, le développement de techniques tel que la prothèse rétinienne redonne l'espoir à ces patients de revoir un jour. Toutefois, cette technologie n'est pas accessible à des patients ayant perdu la vue suite à une rétinopathie diabétique (atteintes des vaisseaux de la rétine) ou à un glaucome (atteinte du nerf optique). C'est à eux que s'adresse principalement cette étude qui vise à restaurer la vision chez ce type de patients.

Dans des études actuellement en cours, nous voulons étudier la possibilité d'utiliser l'optogénétique dans des aires visuelles cérébrales comme outil pour restaurer la vision à des patients présentant des déficits visuels.

Dans le présent projet, nous voulons étudier les réponses obtenues dans les aires cérébrales d'intérêt ainsi que la réponse comportementale de rats soumis à cette nouvelle technologie.

Cette étude sera menée sur des rats normaux et sur un modèle murin de rétinopathie pigmentaire couramment utilisé par la communauté scientifique.

Au total 245 animaux seront nécessaires à cette étude en incluant les pré-tests et les contrôles.

L'utilisation de l'animal est indispensable dans ce projet; le comportement animal ne peut être étudié sur des modèles de cellules en culture. Conformément à la « règle des 3R » décrite au 2° de l'article R214-105, nous avons limité au maximum le nombre d'animaux nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement interprétables. Les rats seront examinés quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries et seront hébergés dans les conditions conformes à la réglementation. Les animaux bénéficieront si besoin d'une anesthésie générale (fixe ou gazeuse). Pour les procédures de chirurgies, la douleur sera prévenue par administration d'opioïdes en pré et post opératoire. Une signalétique particulière des animaux en expérimentation est utilisée. Elle permettra une surveillance plus adaptée selon les procédures afin de s'assurer de leur bien-être.

15143 Nous développons actuellement une nouvelle protéine analogue du collagène, utilisable par voie générale, comme candidat-médicament pour le traitement de situations hémorragiques dans différents contextes (accidents de la route, sur les champs de bataille, lors d'interventions chirurgicales en urgence chez des patients sous antiplaquettaires, hémorragies internes, intracrâniennes, ...). Pour sa validation préclinique à l'aide de modèles de saignements induits chez l'animal, nous avons besoin de confirmer que le mécanisme d'action recherché, une activation systémique des plaquettes sanguines, est bien présente dans les animaux retenus pour cette étude. Le modèle choisi, qui sera réalisé par un de nos partenaires, dans la suite de ce travail, est un modèle hémorragique hépatique induit chez le lapin. Avant de lancer l'étude cette étude, nous souhaitons donc pouvoir valider sur des prélèvements sanguins de lapins normaux et sous-antiplaquettaires que notre collagène est bien actif et déterminer la dose à injecter *in vivo*. Cette étape nous permettra également de valider les outils nécessaires à la validation de plaquettaire chez le lapin.

Pour cette étude, 1 seul lapin New Zealand White sera utilisé car nous estimons que les lapins provenant de cette souche génétiquement caractérisée sont tous identiques et que la réponse d'un lapin à l'autre sera identique dans nos tests *in vitro* (Réduction).

En ce qui concerne la douleur, seul le point de piqûre à l'oreille pour le prélèvement de sang peut générer de la douleur qui sera diminuée/inhibée par l'utilisation d'un gel analgésique local. Par ailleurs, les lapins sont hébergés en binôme avec une tablette de repos et une galette de foin + eau à disposition (Raffinement).

Enfin, cette étude étant une étude préliminaire à la réalisation du modèle hémorragique *in vivo* chez le lapin New Zealand White, nous souhaitons réaliser cette étude dans la même espèce que le modèle hémorragique. Cette étude nous permettra, d'une part, de valider l'activité de notre molécule sur les plaquettes de lapins et déterminer la dose à injecter dans le modèle hémorragique et, d'autre part, de mettre en place les outils analytiques chez le lapin pour valider l'efficacité de notre molécule dans le modèle hémorragique *in vivo* (Remplacement).

15144 Nos études concernent différentes étapes de la transition entre un cerveau sain et épileptique. Elles sont impossibles chez l'homme puisque le diagnostic d'épilepsie est porté quand la maladie est constituée. Seuls les modèles animaux permettent d'étudier les modifications cérébrales conduisant à l'émergence de la maladie. Nous étudierons trois phases retrouvées chez l'homme : 1) un état de mal produisant la mort neuronale, 2) les processus d'épileptogénèse incluant l'inflammation et la réorganisation neuronale et synaptique et (3) les processus qui déclenchent les crises d'épilepsie partielle. Nous utiliserons des animaux ayant reçu une neurotoxine injectée de façon focale dans une aire du cerveau susceptible de produire les crises d'épilepsie mais aussi des animaux avec une perfusion de molécules humaines de patient atteint d'encéphalite auto immune. Nos techniques incluent l'anatomie, l'imagerie non-invasive du cerveau ainsi que l'électrophysiologie sur animaux en mouvement libre, anesthésiés et sur tranches de tissu cérébral préparées à partir du cerveau des animaux épileptiques. Le but de ces études est une meilleure compréhension des processus de sclérose et d'épilepto-genèse ainsi que l'amélioration des thérapies anti-épileptiques et neuroprotectrices. Ces questions doivent être étudiées avec les modèles animaux d'épilepsie, puisque : (1) L'ensemble des phénomènes pathologiques peut difficilement être étudié chez l'humain. (2) La culture cellulaire, du fait de sa connectivité réduite, ne reproduit pas toutes les propriétés des crises générées sur cerveau entier incluant les spécificités du site d'initiation et le patron de propagation. (3) La modélisation informatique nécessite des données originales telles que nous espérons découvrir par les expériences prévues. Les rongeurs présentent plusieurs avantages pour nos travaux. Ils ont un cerveau assez complexe pouvant générer les activités épileptiques. Puisque le modèle animal d'épilepsie que nous utiliserons a été développé chez le rongeur (rat et souris), d'abondantes données sont déjà disponibles. Les souris et rats se prêtent aussi à la modification génétique qui facilitera certains de nos travaux. Bien que les animaux ne puissent pas être remplacés dans nos expériences, nous prenons les mesures afin de réduire leur utilisation. Certains de nos travaux seront mieux accomplis en ayant recours à du tissu cérébral humain disponible après chirurgie de résection chez des patients ayant des épilepsies réfractaires. La culture cellulaire ou organotypique ainsi que la modélisation par ordinateur seront utilisées pour certains aspects de nos travaux. Nous raffinons sans cesse notre hébergement et utilisation des animaux afin de réduire la douleur et améliorer le bien-être animal. Nous sommes convaincus que seuls de tels procédés nous permettront de produire un meilleur modèle des processus biologiques et pathologiques que nous étudions. Pour ce projet, nous utiliserons deux espèces la souris et le rat. Les groupes d'expérimentations seront les suivants : 410 rats + 400 souris = 810 animaux

15145 Le syndrome de Rubinstein-Taybi (SRT) est une anomalie du développement embryonnaire d'origine génétique, elle est caractérisée par des troubles cognitifs et des anomalies squelettiques. Le SRT associe un retard du développement psychomoteur évoluant vers un déficit mental modéré à sévère, un retard de croissance à début post-natal, et des critères dysmorphiques et malformatifs. C'est une condition rare qui se produit dans 1/125 000 des naissances.

Une équipe a créé une souris modifiée génétiquement (souris CBP-KO) qui permet de modéliser les troubles cognitifs liés à ce syndrome. Ils ont notamment montré que des processus moléculaires étaient altérés, spécifiquement dans la région cérébrale critique pour la mémoire, l'hippocampe.

Dans notre projet, nous souhaitons tester les effets bénéfiques sur la mémoire d'un médicament qui est déjà commercialisé, le Valproate, sur ces souris modèles du SRT. Le principe actif de ce médicament est connu pour améliorer les processus moléculaires qu'une équipe a précédemment retrouvé chez ces souris. Nous souhaitons ainsi, améliorer les déficits cognitifs liés à ce syndrome.

Ainsi, ce projet sollicite plusieurs tests comportementaux, dont un modèle comportemental en labyrinthe radiaire (décliné en plusieurs variantes) développé au sein de l'équipe au cours des 15 dernières années. Au cours de ce test, basé sur la recherche de nourriture, il est nécessaire d'effectuer une légère restriction alimentaire afin d'induire une motivation des animaux.

Les animaux utilisés dans cette étude seront donc des souris modifiées génétiquement CBP-KO et leur contrôles, souris sans modification génétique, au nombre de 840.

L'utilisation de ces animaux se justifie pour plusieurs raisons

1) Aucune alternative ne permet de se passer de l'utilisation de modèles animaux lorsqu'il s'agit d'étudier les processus de mémorisation. En effet, ce type d'étude repose sur l'analyse du comportement animal et nécessite d'avoir une espèce suffisamment proche de l'espèce humaine pour en extrapoler les résultats.

2) L'organisation du système nerveux central de ces animaux est suffisamment proche de celle de l'homme pour permettre une extrapolation acceptable des résultats obtenus à l'espèce humaine.

3) Le modèle comportemental a été établi chez la souris et l'ensemble des appareils comportementaux que nous utiliserons sont dimensionnés pour cette espèce.

Dans la mesure où le remplacement n'est pas envisageable à l'heure actuelle sur ce type d'études, nous nous efforcerons d'honorer les deux autres points qui sont le raffinement et la réduction.

Concernant la réduction, l'effectif se justifie par l'utilisation d'un nombre suffisant d'animaux dans chaque condition expérimentale afin que les analyses statistiques envisagées puissent être concluantes. Nous avons en effet déterminé ce nombre suites aux expériences précédentes utilisant les mêmes tests comportementaux.

Concernant le raffinement, les souris issues de centres d'élevages agréés, seront hébergées tout au long de leur vie en cage collective avec un environnement enrichi dans une animalerie agréée comportant une régulation de la température, de l'hygrométrie et du cycle jour/nuit. Elles recevront de l'eau et de la nourriture à volonté avant le début des tests comportements, elles seront changées régulièrement et elles seront observées tous les jours de la semaine et pesées 1 fois par semaine par un personnel qualifié. Au cours de ces observations, si un animal présente des blessures, il sera immédiatement soigné et surveillé deux fois par jour. Si un animal présente un comportement anormal traduisant un état de mal être (perte de poids, poils hérissés, prostration...), il sera immédiatement isolé et surveillé. Si l'animal ne montre pas d'amélioration significative, il sera euthanasié dans les 48h.

Nous nous appliquerons à préparer méticuleusement les expériences en analysant chaque paramètre, en anticipant les éventuels problèmes et en utilisant que les groupes d'animaux où les conditions expérimentales sont nécessaires et suffisantes pour répondre à notre objectif. De plus, la réalisation des expériences sera confiée à des personnels expérimentés. Le présent dossier démontre par la suite la conformité des expérimentations envisagées qui se feront en complète adéquation avec la nouvelle directive européenne.

15146 Projet La cirrhose représente un véritable problème de santé publique. L'encéphalopathie hépatique est une des complications de la cirrhose. Elle est définie par des troubles des fonctions supérieures allant d'un simple ralentissement jusqu'au coma.

Les mécanismes entraînant la survenue de l'encéphalopathie sont mal compris et c'est la raison pour laquelle les traitements en sont limités. Une des hypothèses physiopathologiques est une altération de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique les résultats préalables obtenus lors du Master 2 vont dans ce sens et montrent une augmentation de la perméabilité aux solutés. Il s'agit désormais de comprendre par quels mécanismes cette perméabilité est augmentée modification des jonctions serrées inter-cellules endothéliales ? rôle de l'inflammation ?

Notre projet a pour but d'explorer cette hypothèse en étudiant les cerveaux de rats atteints de cirrhose et d'encéphalopathie, en privilégiant à chaque étape l'analgésie et le bien-être des animaux. Nous prévoyons par la suite de compléter l'étude en relayant les modèles animaux par

des modèles *in vitro* de barrière hémato-encéphalique afin d'explorer les mécanismes d'une éventuelle modification de perméabilité.

De plus, pour limiter le nombre d'animaux utilisés, nous pourrions séparer les deux hémisphères de chaque cerveau afin de concentrer le maximum de techniques sur un minimum de tissu. Cette étude portant sur du tissu cérébral *in toto* permettra de mieux caractériser les mécanismes de l'encéphalopathie et de dessiner de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Les animaux

* Type Rats Wistar mâles adultes

* Nombre : Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 550 rats pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

La conformité au principe des 3R

*Remplacement Un système vivant est nécessaire pour étudier les phénomènes mis en jeu dans le développement de l'encéphalopathie hépatique sur cirrhose. Il n'est pas possible de recréer *in vitro* la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs cellulaires rentrant en jeu. Notre choix s'est porté sur le rat car sa taille permet une faisabilité de l'étude anatomopathologique de l'encéphale. Les modèles existants de barrière hémato-encéphalique sont des cellules endothéliales de rat notre étude pourra donc ainsi compléter les données sans barrière d'espèce.

*Réduction Nous limitons au maximum le nombre d'animaux par groupe de façon à obtenir des résultats statistiquement fiables. A cause des variabilités inter-animales et intergroupes, un nombre trop restreint d'animaux engendrerait des résultats trop variables et non valides. Nous prévoyons également de réaliser des groupes de mise au point des techniques afin de limiter le nombre total de rats nécessaire à la bonne conduite du projet. Les groupes contrôles (Sham ou RedOil) pourront être constitués d'un nombre plus limité d'animaux (10 vs 20).

*Raffinement Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures ont été mises au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation, les animaux disposent de nourriture et d'eau *ad libitum* et le milieu est enrichi. Nous nous efforçons à chaque instant de raffiner nos procédures afin de garantir le bien-être des animaux en cours de procédure grâce à une surveillance attentive (point limite) et des soins adaptés (anesthésie, analgésie, etc.).

15147 Le bien-être des animaux de production est une thématique grandissante. Il a été observé sur le terrain au travers de plusieurs essais en fermes conventionnelles que des associations d'extraits végétaux concentrés permettaient d'optimiser la digestion des bovins, ce qui se traduit pour les éleveurs par des animaux plus calmes et une production plus élevée. *In vitro*, des modifications de l'écosystème ruminal ont également été observées. En revanche, il n'existe à ce jour aucune explication *in vivo* sur le mode d'action des associations d'extraits végétaux concentrés. Pourtant, comprendre le mode d'action permettrait d'optimiser l'utilisation de ces produits choix des doses adaptées, associations d'extraits végétaux pertinentes, etc. L'entreprise commercialisant ces associations d'extraits végétaux concentrés a donc décidé de commanditer une étude pour tester ses produits en conditions contrôlées afin de mieux comprendre leur mode d'action.

Le présent projet vise à évaluer l'effet de trois produits sur le fonctionnement de l'écosystème ruminal et de comprendre les mécanismes d'action à l'origine des effets bénéfiques observés sur l'hôte.

Les bovins inclus dans l'étude sont huit vaches laitières taries réparties en quatre groupes de deux individus afin de tester les trois produits et un régime témoin. Les vaches reçoivent donc à tour de rôle quatre traitements différents. L'étude est composée de quatre périodes de trois semaines séparées chacune par deux semaines de repos. Dans le schéma expérimental utilisé, chaque vache

est son propre témoin puisque chaque paire teste les quatre traitements dans un ordre différent. Ce dispositif permet d'utiliser un nombre minimal d'animaux tout en ayant la puissance statistique requise. En effet, les bovins sont conduits en conditions contrôlées et uniformes afin de minimiser les variations liées à l'environnement. Cela permet de répondre au principe de réduction du nombre d'individus utilisés. Le remplacement du bovin par un autre modèle animal ou par un essai *in vitro* ne permettrait pas d'obtenir des résultats utilisables chez la vache.

L'avant dernier jour de chaque période des observations comportementales ont lieu au moyen de caméras de surveillance afin de ne pas perturber le comportement des animaux. Les prélèvements nécessaires à l'évaluation de l'effet des différents produits sur l'écosystème ruminal et à la compréhension des mécanismes d'action à l'origine des effets bénéfiques observés chez la vache ont lieu le dernier jour de chaque période expérimentale. Ils sont donc séparés de cinq semaines. Ils consistent en un prélèvement de contenu ruminal par sondage. Ce prélèvement est réalisé en cinétique, c'est-à-dire qu'il y en a quatre par journée de prélèvement afin d'observer les variations dans les neuf heures suivant le repas. De plus, des prélèvements de fèces par fouille rectale et de sang via la veine caudale seront effectués une fois par journée de prélèvement pour évaluer l'intégrité de la muqueuse intestinale et l'écosystème fécal. Dans une optique de raffinement, les bovins sont manipulés dans un couloir adapté à leur contention pour éviter tout risque de blessure. La collecte de contenu ruminal est un geste couramment réalisé qui ne nécessite pas d'analgésie ou de sédation. Afin de respecter leur bien-être, les animaux seront logés sur une litière de paille dans des cases voisines leur permettant de se voir et de se sentir. Les cases sont enrichies avec des brosses pour permettre aux vaches de se gratter. Au quotidien, le personnel animalier observe le comportement de chaque vache le matin au moment de la distribution du repas afin de repérer les signes de mal-être ou de souffrance. Ces signes inhabituels sont immédiatement signalés au responsable de l'expérimentation. Ces animaux seront soignés et si jugé nécessaire par le vétérinaire traitant retirés de l'essai.

15148 Les Métalloprotéases Matricielles ou MMP, au nombre de 23 chez l'homme, appartiennent à la grande famille des protéases contenant plus de 500 membres. Les MMP, à l'instar de l'ensemble des protéases, catalysent la coupure d'une liaison au sein des protéines (protéolyse d'une liaison peptidique), conduisant à leur dégradation. Agissant essentiellement à l'extérieur de la cellule, les MMP sont ainsi capables de dégrader collectivement l'ensemble des composants de la matrice extracellulaire tels que le collagène et l'élastine. Il est aujourd'hui avéré que ces enzymes sont impliquées dans un grand nombre de processus biologiques qui vont bien au-delà du simple remodelage de la matrice extracellulaire. Elles jouent en effet un rôle clé dans l'implantation des embryons, durant les étapes de cicatrisation et d'ossification et lors du contrôle de la réponse immunitaire. Une activité protéolytique aberrante et non contrôlée des MMP est par ailleurs associée à i) de nombreuses pathologies chroniques à composante inflammatoire telles que l'asthme, l'emphysème, les maladies pulmonaires obstructives chroniques, l'athérosclérose et l'arthrite rhumatoïde ainsi ii) qu'à la progression tumorale et la prolifération métastatique. Dans l'ensemble de ces processus physiopathologiques, le rôle des MMP demeure néanmoins difficile à appréhender en raison de leur intégration dans de multiples réseaux de protéases et de leur propension à dégrader une grande diversité de substrats peptidiques.

S'intéresser aux MMP comme cibles thérapeutiques pertinentes nécessite notamment d'identifier de façon non ambiguë quelles sont les MMP surexprimées au sein du tissu pathologique et quelles sont celles qui supportent effectivement le développement de la pathologie. Cette tâche est d'autant plus complexe que ces critères peuvent évoluer selon le stade de la pathologie. Les MMP sont également considérées comme des bio marqueurs et dans certaines situations comme des marqueurs spécifiques d'un stade particulier d'une pathologie.

En raison de sa similitude anatomique forte permettant une extrapolation aux conditions d'utilisation en pratique clinique chez l'homme, le rongeur est un modèle mammifère dont le profil pharmacologique permet une utilisation préclinique. Dans cet optique, nous proposons de développer plusieurs modèles murins au sein desquelles des MMP sont surexprimées i) un modèle

d'athérosclérose, ii) un modèle de maladies pulmonaires obstructives chroniques, iii) un modèle de péritonite et iv) un modèle métastatique de cancer du sein.

Dans le cadre de ce projet, nous proposons d'évaluer *in vivo* dans ces différents modèles, d'une part des petites molécules chimiques (sondes chimiques) permettant la détection sensible et spécifiques des MMP et d'autre part des anticorps dirigés contre les MMP et fonctionnalisés avec un cytotoxique. Si elles s'avèrent efficaces à détecter la présence d'une ou plusieurs MMP dans un fluide ou au sein d'un tissu pathologique, ces sondes chimiques constitueront la première étape vers le développement d'outils diagnostiques innovants. En parallèle, l'évaluation des anticorps conjugués à un cytotoxique permettra de proposer de nouvelles pistes thérapeutiques, notamment dans le traitement du cancer du sein.

Ce projet prévoit le recours à 612 animaux sur cinq ans. Ces animaux seront spécialement élevés à cette fin et proviendront d'élevages autorisés. Ce nombre a été réduit au minimum tout en gardant la puissance statistique nécessaire à l'obtention de résultats exploitables.

Bien que les méthodes expérimentales aient été choisies pour éviter toute souffrance aux animaux lors de leur mise en œuvre, l'application de critères d'arrêts et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe, selon les règles en vigueur dans l'animalerie, permettront de garantir leur bien-être. Leur état de santé sera surveillé tout au long de ces projets, ce qui permettra au vétérinaire de l'installation d'intervenir immédiatement et de manière appropriée si nécessaire.

15149 Le cancer de la vessie est le cancer urologique le plus fréquent après celui de la prostate. Touchant principalement les hommes après 50 ans, ce cancer est d'autant mieux traité qu'il est détecté tôt. Le nombre de cas de cancers de la vessie en France augmente et son incidence le place au 6ème rang par sa fréquence. On compte aujourd'hui près de 10 000 nouveaux cas par an et il représente 3,5% des décès par cancer. Il existe différents types de tumeur maligne de la vessie. Le carcinome transitionnel est la forme la plus fréquente (90 % des cancers de la vessie) suivi par le carcinome épidermoïde (7 %) et l'adénocarcinome (1 %). Les lésions non carcinomateuses correspondent aux lymphomes, sarcomes et tumeurs neuro-endocrines de la vessie dont le traitement diffère des carcinomes.

Le traitement des tumeurs de la vessie dépend de leur nature et de leur caractère infiltrant ou non et métastatique ou non. Les moyens thérapeutiques sont la chirurgie, la radiothérapie externe, la chimiothérapie et l'immunothérapie avec traitement endo-vésical ou systémique.

Si le cancer superficiel reste de bon pronostic, le risque de rechute suite à l'ablation des tumeurs par les voies naturelles reste élevé, ceci étant dû, en partie, aux tumeurs résiduelles non détectables par endoscopie conventionnelle. C'est pourquoi, une nouvelle technique consiste à procéder à une ablation chirurgicale guidée par la fluorescence de molécules photoactivables (appelées photosensibilisateurs) localisées préférentiellement dans les lésions tumorales. La molécule ayant reçu l'AMM en 2005 pour ce type de procédure est l'Hexvix® (h-ALA), une pro-drogue à base d'acide 5-aminolévulinique qui est métabolisée en un produit fluorescent (protoporphyrine IX) au niveau des tumeurs. Cependant, malgré le taux de tumeurs résiduelles significativement inférieur obtenu par cette méthode, le nombre de faux positifs est plus élevé que lors d'une ablation chirurgicale classique. Ceci peut être imputé à l'imparfaite sélectivité tumorale du photosensibilisateur. L'utilisation de l'immunothérapie utilisant des composés stimulant le système immunitaire appelés immunogènes et ciblant des récepteurs spécifiques exprimés au niveau des tumeurs vésicales, en combinaison avec l'Hexvix®, pourrait permettre une meilleure efficacité du traitement par thérapie photodynamique.

L'objectif de ce projet est d'étudier les effets de 2 composés immunogènes ciblant la protéine PDL1 (anti-PDL1) en combinaison ou non avec un traitement par PDT avec l'Hexvix®, traitement de référence, sur des tumeurs vésicales chez le rat, ce qui ne peut être réalisé sur des modèles *in vitro* ou *in silico* (remplacement). 204 rats femelles Fischer 344 seront utilisés pour ce projet, répartis en groupes de 6 ou 12 animaux. Les animaux seront placés à 2 par cage, sans enrichissement du milieu pour comparer les résultats avec les précédentes études effectuées dans les mêmes conditions. Les 2 composés immunogènes seront administrés par voie générale (intrapéritonéale),

ou par voie locale par les voies naturelles (instillation vésicale), et l'Hexvix® ou du chlorure de sodium (NaCl) sera également administré par instillation vésicale. Ces composés ne sont pas génotoxiques pour les cellules, pas toxiques pour les animaux aux doses testées, et n'induisent pas d'allergie.

L'induction de tumeurs de vessie est effectuée sous anesthésie par abrasion de la surface de la vessie sur une zone limitée dans l'axe de la vessie à l'aide d'un abraseur introduit par l'intermédiaire d'un cathéter placé dans les voies naturelles (urètre), suivie de l'instillation vésicale de cellules tumorales de carcinome à cellules transitionnelles de vessie d'origine murine (Procédure 1). Le premier traitement avec les 2 composés immunogènes anti-PDL1 débute 4 jours après induction des tumeurs vésicales et 3 autres traitements sont effectués 8, 12 et 20 jours après induction des tumeurs. Les rats traités par instillation vésicale sont placés sous anesthésie et un cathéter est placé dans l'urètre pour laisser les produits au contact de la vessie pendant 1 heure (Procédure 2). Cinq jours après induction des tumeurs vésicales, les animaux sont à nouveau anesthésiés et l'Hexvix® ou le NaCl est administré dans la vessie par l'intermédiaire d'un cathéter placé dans l'urètre et laissé au contact de la vessie pendant 1 heure (Procédure 3) avant réalisation du traitement par PDT avec irradiation en lumière bleue (Procédure 4). Les animaux sont mis à mort 30 jours après induction des tumeurs vésicales par injection d'une surdose d'euthanasique. La vessie est alors prélevée, fixée ou congelée dans de l'azote liquide pour effectuer des analyses en histologie classique et en microscopie de fluorescence après réalisation de coupes à froid (cryostat), ainsi que des analyses de biologie moléculaire notamment de l'expression du récepteur PDL1.

Afin de limiter le nombre d'animaux utilisés (réduction) mais de permettre une approche statistique des résultats obtenus, les groupes de traitement seront constitués de 12 rats pour les groupes traités et de 6 rats pour les groupes contrôle. Les analyses seront effectuées à un stade de développement des tumeurs non invasif, y compris un mois après traitement, ce qui limite l'impact de la maladie sur l'animal (raffinement). Pour supprimer la douleur induite éventuellement par l'induction des tumeurs vésicales et par le traitement par PDT, les animaux recevront deux injections sous-cutanées de Buprénorphine pour l'induction tumorale (1 heure avant et 6 heures après celle-ci), et également deux injections sous-cutanées pour le traitement par PDT (1 heure avant et 6 heures après celui-ci). Les points limites suivis seront l'évolution pondérale des animaux, leur état physiologique (activité, posture, état de la fourrure, tremblements, miction...) et leurs consommations alimentaire et hydrique. En cas d'atteinte d'un point limite, les animaux seront mis à mort par une méthode en conformité avec les recommandations éthiques (injection d'une surdose d'euthanasique).

15150 La prise en charge médicale des patients souffrant de cancer nécessite le recours à différents traitements thérapeutiques injectés visant à tuer les cellules cancéreuses présentes dans l'organisme des patients.

La réglementation impose, avant toute administration chez l'Homme, de disposer d'un rationnel scientifique solide et de preuves de concept d'efficacité *in vitro* mais aussi *in vivo*. Il est donc requis, avant tout essai clinique, d'apporter la preuve que le traitement expérimental atteint bien la cible visée et qu'il déclenche la mort des cellules cancéreuses ciblées.

La démonstration du bon ciblage du traitement expérimental se fait en premier lieu sur les mêmes lignées cellulaires que celles ayant servi pour les études préalables *in vitro* mais dans un contexte *in vivo*, reproduisant les interactions entre les différents types cellulaires telles que les cellules endothéliales et les cellules stromales mais aussi reproduisant la diffusion sur l'ensemble de l'organisme (invasion, métastase) ainsi que les propriétés de métabolisation de l'organisme qui ont un impact significatif sur la distribution et la disponibilité des médicaments potentiels ainsi que l'impact du système immunitaire.

Pour cela, nous nous basons sur des lignées cellulaires tumorales injectées sur souris. Ces lignées cellulaires sont disponibles sur commande auprès de fournisseurs agréés, ce qui permet d'avoir accès à la quasi-totalité des lignées cellulaires utilisées par la communauté scientifique mondiale. Si les lignées cellulaires sont moins proches des tumeurs humaines que les xénogreffes de tumeurs, leur diversité et leur disponibilité sur commande, permet de sélectionner, pour chaque traitement,

la ou les lignées permettant de l'évaluer de façon pertinente. Elle permet également de pouvoir évaluer un traitement expérimental *in vivo* sur la ou les mêmes lignées cellulaires que celles utilisées pour les preuves de concept *in vitro*.

L'objectif de ce projet est donc de confirmer *in vivo* les propriétés antitumorales de traitements innovants (petite molécule et/ou biothérapie) ayant présenté une activité *in vitro*. Il est également d'identifier les traitements présentant un intérêt thérapeutique fort *in vivo* mais aussi de définir les paramètres nécessaires au choix de leur posologie en vue de leur utilisation future en développement préclinique aval, notamment sur modèles de PDX, puis en clinique.

Ces études *in vivo* constituent une des nombreuses étapes du développement préclinique d'un traitement mais ce travail sur organisme entier ne peut être remplacé.

Les évaluations *in vivo* seront réduites aux seuls traitements ayant démontré préalablement une efficacité antitumorale *in vitro*. Réduisant ainsi les essais aux seuls traitements ayant un potentiel d'utilisation clinique fort. Ainsi sur 10000 traitements qui vont entrer en essai *in vitro*, moins de 250 seront évalués *in vivo*.

Afin de raffiner les études et garantir la qualité des résultats, l'ensemble des études se déroulent dans des conditions d'hygiène rigoureuses, permettant d'assurer un statut sanitaire optimal et prévenir des problèmes de santé. Dans chaque cage, les animaux recevront un enrichissement de milieu (Neslets) il est également prévu un ajout d'enrichissement supplémentaire (bâtons de bois, Dome house) en cas de bagarre et une supplémentation de l'alimentation en gel nutritif en cas de perte de poids.

Le projet dont la durée sera de 5 années sera constitué de 50 études visant à évaluer 50 traitements innovants sur lignées cellulaires. Les études comprendront chacune 60 animaux au maximum, soit un total de 3000 animaux au maximum.

15151 La neurotoxicité chronique éventuelle du chlordécone, un insecticide contaminant de façon très importante l'environnement, les animaux et la population aux Antilles, est inconnue, notamment au regard des maladies neurodégénératives des effets délétères précoces sont identifiés chez l'homme, notamment sur le neuro-développement chez les jeunes garçons nés de mères exposées. L'heptachlore, un autre insecticide organochloré à l'origine d'une contamination environnementale et humaine à Hawaï a un effet délétère chez la souris dans les régions du cerveau (système nigro-strié) atteintes lors de la maladie de Parkinson et a été associé à des lésions cérébrales chez l'homme. Notre projet propose de comparer les effets neuropathologiques, notamment sur le système nigro-strié, de ces 2 substances chez la souris C57Bl/6 mâle. Les souris sont exposées à chacune des 2 substances par injections intra-péritonéales répétées (2/semaine) pendant 8 semaines, comme déjà décrit dans une étude publiée avec l'heptachlore. Pour deux lots expérimentaux les animaux sont les descendants mâles de mères exposées à faible dose par voie alimentaire à chacune des deux substances pendant la gestation et la lactation. Le projet nécessite au total 120 souris, nombre réduit au maximum conformément à la règle des 3R, et les animaux, suivis quotidiennement, sont également hébergés dans un environnement enrichi. Les animaux sont sacrifiés une semaine après la fin des expositions au chlordécone ou à l'heptachlore et feront alors l'objet pour 90 souris de prélèvements post-mortem destinés à des analyses biochimiques et histopathologiques permettant de rechercher les effets neuropathologiques en étudiant la neurodégénérescence, en particulier du système nigro-strié, l'agrégation de l'alpha-synucléine et la neuroinflammation dans le système nerveux central et périphérique, sur la base des critères actuellement reconnus dans la physiopathologie de la maladie de Parkinson. Trente autres animaux exposés de la même façon sont par ailleurs destinés à étudier le métabolisme de ces deux substances et surtout leur capacité à s'accumuler dans les différentes régions du cerveau. Cette étude permettra ainsi de déterminer le potentiel neurotoxique du chlordécone en lien avec la maladie de Parkinson, de façon comparée à l'heptachlore pour lequel des données sont déjà disponibles.

Le cancer du sein reste la première cause de mortalité par cancer chez la femme. Les campagnes de dépistage permettent de détecter d'éventuelles anomalies très tôt, augmentant ainsi grandement l'efficacité des traitements et les chances de guérison des patientes. Les carcinomes canaux in situ (CCIS) représentent environ 25-30% des cancers du sein diagnostiqués. Ces tumeurs représentent une prolifération de cellules cancéreuses à l'intérieur des canaux galactophores sans dissémination. Le traitement varie suivant les facteurs de risque, notamment la taille de la tumeur au moment du diagnostic (le risque augmente avec la taille), son grade (le risque augmente avec le grade) et l'âge de la patiente (risque plus élevé chez les patientes de moins de 40 ans) il inclut une mastectomie partielle ou totale. Les risques augmentent de façon significative en cas de diagnostic tardif, en particulier dans le cas des tumeurs invasives avec dissémination des cellules cancéreuses dans le sein en dehors du site primaire de la tumeur incluant une atteinte ganglionnaire et la présence de tumeurs secondaires (métastases). Le traitement peut inclure la chirurgie, la chimiothérapie, la radiothérapie et le traitement hormonal du cancer du sein.

Par conséquent, une meilleure compréhension des mécanismes responsables de l'invasion tumorale dans les cancers du sein est essentielle afin de développer de nouveaux traitements capables de contrôler et de bloquer la progression de ces tumeurs qui peuvent avoir une issue fatale.

Différents systèmes expérimentaux basés sur des lignées de cellules cancéreuses cultivées dans des conditions se rapprochant du tissu constituant la glande mammaire ont été développés. Grâce à ces modèles de cellules tumorales invasives cultivées *in vitro* nous avons pu identifier et caractériser un nouveau mécanisme dépendant de la compression cellulaire au cours de la croissance tumorale. Ce phénomène est capable d'augmenter significativement le potentiel invasif des cellules tumorales mammaires en induisant l'apparition de dommages dans le matériel génétique des cellules tumorales. Cependant la complexité du processus tumoral ne peut pas être entièrement reproduite avec ces systèmes *in vitro*. En particulier, la glande mammaire est formée d'un réseau de canaux ramifiés et d'alvéoles sécrétrices insérées dans un stroma fibreux et adipeux complexe sous contrôle hormonal. A l'heure actuelle, il reste indispensable de valider les conclusions basées sur l'observation des cellules tumorales en culture dans des modèles animaux reconstituant le développement progressif d'une tumeur dans son environnement naturel. En particulier, nous disposons d'un système d'injection de cellules cancéreuses reproduisant la progression de tumeurs invasives dans la glande mammaire chez la souris dans des conditions très similaires à l'évolution des tumeurs chez les patientes. Grâce à nos avancées réalisées *in vitro*, nous pouvons formuler des hypothèses très précises sur la contribution essentielle de ce nouveau mécanisme dans l'apparition de cancers agressifs. En conséquence, nous avons pu affiner nos questions et nous pouvons valider nos hypothèses en utilisant un nombre très limité d'animaux. Dans ce projet le nombre d'animaux utilisés sur 5 ans est évalué à 600. En accord avec les recommandations internationales dans le domaine de la cancérologie, les animaux sont suivis quotidiennement afin d'assurer leur bien-être et les expérimentations sont arrêtées avant la souffrance des animaux. De plus lorsque les animaux seront sacrifiés à la fin des expérimentations, les glandes mammaires sont prélevées, fixées et soit conservées en paraffine soit marquées par immunofluorescence pour pouvoir réaliser des analyses complémentaires sur les tissus. Toutes les précautions seront donc prises pour réduire le nombre d'animaux utilisés, tout en étant assuré de tirer des conclusions précises et très informatives à partir des résultats obtenus et pour limiter la souffrance et le stress des animaux (anesthésie, soins opératoires et post opératoires, suivi particulier des animaux opérés à l'animalerie...). Par ailleurs, nos études portant sur la caractérisation des étapes précoces de l'invasion tumorale, nos expériences sont arrêtées quand la tumeur primaire est toujours à un stade précoce et de taille réduite, donc avant toute souffrance des animaux.

Ce projet contribuera à une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans l'évolution et l'agressivité des tumeurs du sein observées dans un environnement très proche des cancers du sein chez la femme avec la possibilité d'améliorer la panoplie des traitements existants dans les cancers du sein.

15153 L'hémiplégie laryngée ou cornage est une affection due à une lésion du nerf laryngé récurrent, gauche le plus souvent, se traduisant en particulier par une perte progressive des muscles permettant l'ouverture du larynx, avec paralysie progressive et évolutive du cartilage aryénoïde qui ne s'ouvre plus correctement lors de l'inspiration. Ceci a pour conséquence l'apparition d'un bruit et d'une intolérance à l'effort, qui limite les performances du cheval atteint.

Le traitement chirurgical de référence de l'hémiplégie laryngée chez le cheval repose sur la pose d'une prothèse permettant de garder le larynx en position ouverte et du retrait de la corde vocale du côté atteint. Les complications sont cependant fréquentes et incluent entre autres la détente de la prothèse, la persistance d'une toux ou les fausses déglutitions. Par analogie avec la chirurgie humaine, d'autres techniques ont été développées, comme la ré-innervation sélective du larynx. Cette technique très attractive, notamment chez les jeunes chevaux n'ayant pas encore débuté leur carrière et chez les étalons à haute valeur génétique, est couramment effectuée en utilisant un nerf de l'encolure (C1-C2) et ses rameaux. Cette chirurgie a été développée via un travail de recherche réalisé au sein de notre équipe.

La limite de cette technique est que le nerf C1-C2 fonctionne uniquement à l'exercice, ce qui ne permet pas de vérifier la fonction laryngée au repos, et nécessite un niveau d'activité suffisant pour faire travailler le muscle réinnervé. Le nerf accessoire est un autre nerf qui chemine à proximité du larynx, et qui possède en particulier une branche ventrale, innervant le muscle sternocéphalique. Or il a été montré que ce muscle fonctionne à l'exercice et au repos. Suite à une étude pilote, il a été en particulier démontré que cette activation est intense lorsque le cheval broute. Cette caractéristique rend ce nerf particulièrement intéressant, car le muscle réinnervé par le nerf accessoire serait stimulé au repos pendant la période de convalescence du cheval.

L'objectif de ce nouveau projet est de démontrer la possibilité de réinnervation laryngée par cette nouvelle technique la qualité de la réinnervation sera également étudiée au plan histologique.

Pour ce projet, 5 chevaux sains, idéalement des pur-sangs, seront recrutés pour cette étude. Dans un premier temps, le nerf laryngé récurrent gauche sera sectionné afin d'obtenir une paralysie laryngée gauche. Une réinnervation du muscle cricoaryénoïdien sera ensuite effectuée 4 à 8 semaines plus tard, lorsque les chevaux auront atteint le grade de paralysie laryngée souhaité. L'évolution clinique des chevaux sera suivie sur 12 mois, grâce à des examens endoscopiques au repos et à l'effort, des examens d'imagerie médicale (échographie du larynx) et des examens fonctionnels du muscle sternocéphalique gauche. En fin de protocole, des analyses histologiques des muscles laryngés et du nerf accessoire seront réalisées.

En raison de notre expérience antérieure dans ce domaine de recherche, le nombre de 5 chevaux nous semble adéquat, afin d'appliquer le principe de réduction. Il n'est pas possible d'obtenir ces informations fonctionnelles *in vitro*, et seul un suivi prolongé et standardisé permet l'évaluation du processus de réinnervation et ses conséquences fonctionnelles. Les chevaux recrutés seront hébergés au pré en troupeau en dehors des périodes post-opératoires et des phases de tests.

15154 La migraine, considérée l'affection neurologique la plus fréquente et la 6ème cause de handicap dans le monde, est caractérisée par des maux de tête et des nausées pouvant durer de 4-72h en l'absence de traitement. Elle touche préférentiellement les femmes 18% par rapport à une incidence de 6% chez les hommes. Les patients migraineux ont des troubles sensoriels -photophobie (aversion à la lumière), phonophobie (sensibilité aux sons forts) et allodynie (douleur occasionnée par un stimulus non douloureux) - et émotionnels -dépression, anxiété- aussi bien pendant qu'entre les crises de migraine. Cela conduit généralement les malades à s'isoler, loin de leur travail, de leur famille et de leurs activités quotidiennes. Malgré les avancées en recherche, il existe encore une connaissance insuffisante des mécanismes neurobiologiques impliqués dans le déclenchement des céphalées et la chronicisation de la maladie, qui complique le diagnostic et un traitement ajusté.

Des études cliniques récentes montrent que la migraine est influencée par l'alimentation et le microbiote intestinal. Les métabolites dérivés de l'activité bactérienne dans le tractus gastro-intestinal peuvent influencer l'activité cognitive du cerveau, et être impliqués dans des maladies comme le Parkinson, la migraine ou l'autisme. Par ailleurs, des maladies métaboliques (obésité,

hypertension, diabète, syndrome de l'intestin irritable) sont très répandues chez les migraineux, même si une relation non causale n'a jamais été démontrée. Certainement dû à la carence d'études qui s'intéressent au rôle de l'alimentation dans la migraine. Il n'est donc pas clair quels sont les aliments qui empêchent ou provoquent les céphalées.

Parmi les nutriments qui pourraient avoir un rôle significatif dans la migraine, nous nous intéressons au tryptophane, acide aminé essentiel apporté par l'alimentation et impliqué dans la synthèse de sérotonine parmi d'autres métabolites. Les dernières études montrent qu'une réduction de l'ingestion de tryptophane augmente l'intensité des nausées et de la douleur, ainsi que l'aversion à la lumière pendant la crise chez les patients migraineux. Dans le tractus gastro-intestinal, environ 4-6% du tryptophane ingéré est transformé par certaines bactéries du microbiote en dérivés indoles capables d'activer les récepteurs des hydrocarbures aromatiques (AhR). Ces récepteurs sont présents sur les cellules immunitaires, les astrocytes (cellules gliales du système nerveux) et certaines populations de neurones. Il a été montré que l'activation des AhR entraîne une action anti-inflammatoire et un rôle de protection, tandis qu'une diminution des dérivés indole du tryptophane dans le cerveau emmène à une augmentation de l'inflammation neuronale et de la neurotoxicité. Compte tenu de (1) la haute comorbidité de la migraine dans les maladies métaboliques où le microbiote est fortement impliqué, (2) le lien entre l'alimentation et les céphalées, et (3) le potentiel rôle des AhR dans l'inflammation et la neurodégénération, nous avons établie l'hypothèse que le tryptophane et ses dérivés indoles jouent un rôle important dans le déclenchement et/ou la chronicisation de la migraine. Ainsi, ce projet vise à établir la contribution du tryptophane, des métabolites indoles et des AhR dans l'initiation et la chronicisation de la migraine, ainsi que dans l'efficacité des traitements conventionnels et les troubles émotionnels et sensoriels associés. D'une durée maximale de 3 ans, il sera réalisé sur un modèle de migraine chez la souris préalablement validé dans notre laboratoire. Les objectifs et les techniques utilisées sont les suivants

- Étudier les conséquences de la dérégulation du métabolisme du tryptophane sur l'instauration, progression et chronicisation de la migraine. Nous allons utiliser une approche comportementale non invasive (i) l'allodynie céphalique sera étudiée par application sur la peau d'une série de filaments de von Frey (stimuli non douloureux) qui nous permettra de déterminer le seuil de sensibilité faciale avant et pendant la migraine (ii) la photosensibilité sera analysée par des tests comportementaux préalablement validés dans notre laboratoire et qui sont basés sur la préférence des rongeurs par les espaces obscurs.

- Analyser la comorbidité du processus migraineux avec des troubles psychiatriques suite à une dérégulation du métabolisme du tryptophane. Nous allons utiliser des tests comportementaux validés qui permettront d'étudier le comportement pro-anxiogène (basé sur l'envie naturelle d'explorer du rongeur et sa peur des espaces ouverts) ou pro-dépressif (comportement de résignation face à une situation nouvelle) des rongeurs.

- Évaluer l'effet d'une dérégulation du tryptophane sur la fonctionnalité de la rétine (organe visuel destiné à recevoir les impressions lumineuses et impliqué dans la photophobie associée à la migraine). Nous allons réaliser des électrorétinogrammes. La souris n'aura aucune souffrance car elle sera anesthésiée tout au long de l'enregistrement.

- Évaluer l'efficacité des antimigraineux communément utilisés dans le traitement de la migraine aiguë et chronique suite à la dérégulation du métabolisme du tryptophane et ses dérivés.

- Étudier l'expression des AHR dans le cerveau afin d'identifier les métabolites potentiellement impliqués dans la migraine qui pourraient devenir des cibles thérapeutiques.

Ce projet s'établit en conformité avec les exigences éthiques de remplacement, de réduction et de raffinement (règle des 3R). Tandis que nous faisons une étude éthologique sur le comportement de l'animal, il n'est pas possible de remplacer l'utilisation de souris par des méthodes alternatives. Cependant, nous utiliserons un nombre réduit d'animaux (maximum de 10 souris par lot expérimental, soit 1440 en total pour 3 ans) tout en gardant la significativité des résultats via une analyse statistique adaptée (le nombre d'animaux est fixé grâce à une étude statistique préalable réalisé dans notre laboratoire). Les conditions d'hébergement des animaux seront adaptées à leurs besoins physiologiques et leur bien-être, qui sera évalué quotidiennement par le personnel en

charge. Ils auront une période d'adaptation à l'expérimentateur et aux conditions de stabulation avant de débiter l'étude comportementale. Des points limites seront mis en place pour toujours préserver l'état physique et le confort des animaux. En plus, les tests comportementaux prévus sont de tests non invasifs, fondés sur l'envie naturelle d'explorer du rongeur.

15155 Les maladies de Charcot-Marie-Tooth (CMT) sont des neuropathies périphériques héréditaires, elles entraînent des troubles sensori-moteurs importants. La forme 1A des CMT est la forme autosomique, dominante et caractérisée par une sur-expression de la protéine PMP22 ce qui provoque une démyélinisation périphérique et un ralentissement de la conduction nerveuse.

Il en est de même chez le rat transgénique hétérozygote la sur-expression de la protéine PMP22 entraîne une démyélinisation périphérique et une atrophie musculaire progressive ces rats présentent donc des déficits moteurs. Il est possible de mesurer ces déficits par des tests comportementaux.

A ce jour il n'existe pas de traitement de cette maladie. Le modèle animal est utilisé pour la découverte de molécules actives. L'objectif du projet est d'étudier l'effet de l'administration chronique de molécules à des rats transgéniques PMP22 CMT-1A dans une batterie de tests comportementaux. Il s'agit également de réaliser des prélèvements permettant d'étudier les paramètres physiologiques, histologiques et moléculaires, couvrant les principales fonctions musculaires. Le projet représente un ensemble d'études types. Le nombre d'études réalisées durant la période de validité de l'autorisation dépendra du nombre d'agents pharmacologiques à tester.

Le projet comprendra jusqu'à 2 études par an (2400 animaux utilisés). A ce jour il n'existe pas d'autre modèles de la maladie de CMT, le recours à l'animal de laboratoire est nécessaire pour étudier l'efficacité de molécules.

Chaque étude comprenant

40 Mâles reproducteurs

80 Femelles reproductrices

120 mâles 15 sauvages (WT wild type) et 105 transgéniques (Tg).

Le nombre de reproducteurs (mâles et femelles) est défini pour obtenir un nombre de petits mâles suffisant (15 WT et 105 Tg). On estime à 75% le ratio de femelles reproductrices qui seront effectivement gestantes. Soit 60 femelles sur 80. On estime qu'en moyenne ces femelles généreront environ 7 petits chacune, soit 420 en tout. 50% de ces petits seront des mâles et 50% présenteront le transgène. Une telle procédure de reproduction permettra d'obtenir les 105 petits mâles Tg maximum dont nous avons besoin pour chaque étude.

Nombre d'animaux par étude 15 animaux par groupe

Des études préliminaires ont permis de déterminer le nombre d'animaux par groupe pour lequel les résultats présentaient une robustesse suffisante.

- 1 groupe de 15 animaux WT

- 1 groupe de 15 animaux Tg recevant du placebo

- Jusqu'à 7 groupes de 15 animaux Tg recevant un traitement à tester (un traitement différent par groupe)

Respect de la règle des 3R

- Réduire. Le nombre total d'animaux utilisés pour une étude est fonction du nombre de groupes et du nombre d'animaux par groupe nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement interprétables.

- Justification du nombre d'animaux par groupe. Compte tenu de la variabilité interindividuelle des variables mesurées dans ce test, ce nombre a été fixé à 15 animaux par groupe. L'utilisation d'un nombre inférieur d'animaux a une probabilité importante d'entraîner la non-validité de l'étude, conduisant à la refaire, et par conséquent à utiliser un nombre d'animaux plus élevé.

- Raffiner. Des animaux présentant des signes de souffrance sont euthanasiés. Outre la motivation éthique conduisant à cette euthanasie, celle-ci est requise pour des raisons expérimentales, la

souffrance d'un animal biaisant les variables comportementales mesurées. L'utilisation de traitements pour pallier à cette souffrance est exclue, ces types de traitement étant susceptibles de modifier le comportement des animaux et l'action pharmacologique des produits étudiés.

- Remplacer. Il n'existe pas à ce jour de modèle n'utilisant pas d'animaux ou nécessitant un nombre plus réduit d'animaux ou ayant un degré de sévérité inférieur permettant d'obtenir des informations équivalentes à celles obtenues par le présent modèle.

15156 La cocaïne est la deuxième drogue illégale la plus consommée en Europe et son utilisation a augmenté au cours des 10 dernières années. Parmi les utilisateurs de cocaïne, tous ne développent pas une addiction seule une minorité vulnérable semble touchée (i.e., 15-20%). Ce qui frappe le plus dans l'addiction, c'est son apparente irrationalité. Les personnes affectées continuent de consommer la cocaïne, malgré un désir récurrent d'arrêter pour s'engager dans d'autres activités moins toxiques et plus acceptées socialement. De manière intéressante la consommation compulsive de drogue n'apparaît pas de manière permanente est absolue. Les personnes diagnostiquées comme présentant une addiction sont capables de choisir d'autres activités non focalisées sur la drogue, en particulier elles sont capables d'un certain degré de contrôle sur leur choix quand elles ne sont pas sous les effets de la drogue. Par contre, lorsque ces individus font leur choix sous influence de la drogue, ils préfèrent exclusivement la drogue aux dépendants d'autres options normalement préférées. Notre projet a pour but de tester l'influence de la drogue sur le choix et se focalisera en particulier sur l'étude des circuits orbitofrontaux, régions du cerveau responsables de la prise de décision et des choix. Ce projet est par essence mécanistique et nécessite une approche invasive qui n'est pas envisageable chez le sujet humain. Sa bonne réalisation repose donc sur le développement et l'utilisation d'un modèle animal - le rat de laboratoire – qui permet de reproduire de façon valide la distinction établie chez l'homme entre individus vulnérables et individus non-vulnérables face à l'addiction. Il s'agira de placer une population de rats face à un choix entre prendre de la cocaïne ou s'engager dans une activité alternative (i.e., boire une boisson édulcorée avec de la saccharine) et, ensuite, de tester l'influence d'une administration passive de cocaïne sur le choix des individus. Le projet consistera également à manipuler *in vivo* l'activité des neurones du cortex orbitofrontal, soit les activer (1 groupe ou lot de 40 rats) ou les inhiber (1 groupe ou lot de 40 rats). Ces manipulations neuronales seront réalisées avant le choix et devraient donc influencer, voire même changer, les préférences individuelles et, selon les cas, induire ou inverser la préférence pour la drogue chez les individus. A terme, ce projet devrait contribuer à élucider le rôle des dysfonctions orbitofrontales dans la physiopathologie de l'addiction. Notre projet nécessite au total l'utilisation de 260 rats mâles sur une période de 4 ans. Ces animaux sont soumis à différentes procédures successives dont le degré maximal de gravité ne dépasse pas le degré « modéré ». Ces procédures sont de deux types chirurgicale et comportementales. Toutes les procédures chirurgicales sont réalisées sous anesthésie, analgésie anti-inflammatoire dans des conditions aseptiques. De plus, pour prévenir toute infection, les animaux reçoivent pendant toute la durée de l'expérience un traitement antibiotique. Il n'existe pas encore de modèles mathématique ou *in silico* permettant de remplacer l'utilisation du rat de laboratoire pour réaliser le projet proposé. L'addiction est un trouble du comportement qui ne peut pas être récapitulé sur des lignées cellulaires (humaine ou animale) ou tout autre modèle *in vitro* cellulaire ou subcellulaire. Toutefois, le nombre d'animaux nécessaire au projet est réduit au minimum. Ce nombre représente un compromis rationnel, compte tenu de l'exigence éthique de réduction du nombre d'animaux et des contraintes expérimentales propres au projet scientifique proposé. Notamment, ce nombre est nécessaire pour étudier de façon concluante les différences individuelles et/ou prophylactiques. Tout au long des expériences, plusieurs critères sont pris en compte pour suivre régulièrement le niveau d'inconfort ou de souffrance des animaux et décider, le cas échéant, de procéder à l'arrêt de l'expérience si le point limite est atteint. Les animaux sont logés par groupe de 2 dans des cages collectives (surface au sol de 940 cm²) afin d'éviter le stress lié à l'isolement social. De plus, ces cages sont enrichies grâce à la présence de tunnels de jeu et de matériel à ronger afin de limiter l'ennui, le manque de stimulation, et ainsi promouvoir leur bien-être. A la fin des expériences, tous

les animaux sont mis à mort de façon indolore et inconsciente, et ne sont donc pas réutilisés dans d'autres expériences.

15157 Les douleurs chroniques affectent près de 7% de la population et s'accompagnent souvent du développement de symptômes anxio-dépressifs.

Le système opioïde est impliqué dans la douleur, l'anxiété et la dépression. Ainsi, un quart des traitements prescrits contre les douleurs chroniques sont composés d'opiacés tels que la morphine. Cependant leur utilisation répétée entraîne des effets secondaires indésirables comme de l'hyperalgésie, de la tolérance voire de la dépendance limitant leur utilisation en clinique. Il est donc indispensable de rechercher de nouvelles pistes thérapeutiques pour traiter ces douleurs.

Les opiacés tels que la morphine exerce leurs effets par l'intermédiaire du récepteur opioïde mu. Cependant il existe un autre récepteur, le récepteur opioïde delta qui joue un rôle dans les douleurs chroniques, l'anxiété et la dépression. Ce récepteur ainsi que son ligand endogène, l'enképhaline, sont exprimés en plus grande quantité en conditions de douleur chronique.

Les interactions fonctionnelles positives entre système opioïde et le système endocannabinoïde, lui aussi impliqué dans la douleur, l'anxiété et la dépression sont bien établies. Au niveau moléculaire, l'association des récepteurs opioïdes et cannabinoïdes semble amplifier la réponse analgésique.

Le cannabidiol (CBD) cible le récepteur endocannabinoïde CB1 et possède des propriétés analgésiques plus faibles que celles du THC, autre composant du cannabis, mais sans les effets psychoactifs indésirables. Le CBD apparait donc comme une substance ayant un fort potentiel dans le traitement des douleurs neuropathiques et des symptômes anxio-dépressifs associés.

Sur la base de ces connaissances, notre projet va explorer l'hypothèse selon laquelle l'administration de doses ultra faibles de CBD (déterminées par des expériences préalables *in vitro*) permettrait de renforcer la réponse du système opioïde endogène grâce à la synergie résultant de l'association entre récepteurs opioïde et cannabinoïde. Pour ce faire nous proposons une étude multimodale intégrant tous les niveaux d'analyse du moléculaire au comportement animal. Ceci permettra d'en évaluer la pertinence en tant que nouvelle stratégie thérapeutique pour soulager la douleur neuropathique et les symptômes anxio-dépressifs.

Dans son ensemble, ce projet nécessitera au maximum 1436 souris. Il sera conduit en respectant la règle des 3R

Réduire les expériences seront réalisées avec la volonté de réduire au maximum le nombre d'animaux par condition expérimentale, mais toujours dans l'optique d'optimiser l'obtention d'information scientifique pour chaque test. La taille minimale des groupes d'animaux est déterminée pour permettre une analyse statistique appropriée. Dans la mesure du possible, les animaux seront successivement utilisés dans plusieurs procédures. De plus, pour réduire le nombre de groupes, les tests comportementaux seront effectués avant et après traitement, ainsi chaque animal sera son propre contrôle. Des expériences pilotes seront réalisées pour déterminer les doses de ligands à injecter et la durée optimale de traitement.

Remplacer pour notre thématique d'étude, il nous est impossible de remplacer notre modèle *in vivo* par un modèle *in vitro* ou *in silico*. La caractérisation de la douleur et de

sa composante émotionnelle et affective nécessite une observation comportementale, uniquement possible chez l'animal vivant et vigile.

Raffiner enrichissement des cages (Des carrés de coton seront placés dans la cage pour favoriser la nidation, et des barreaux de bois à ronger pour limiter les comportements d'agressivité) Les procédures invasives seront réalisées sous anesthésie et analgésie pré-, per- et post-opératoire. La température corporelle de l'animal sera maintenue grâce à un tapis chauffant thermostaté tout au long de la procédure. La douleur sera évaluée en post-opératoire grâce à une fiche d'évaluation objectivée permettant d'identifier des points limites parfaitement adaptés qui permettront d'interrompre la procédure pour limiter la souffrance animale. Des points limites ont été déterminés pour éviter la souffrance à l'animal. Si de nouvelles approches moins stressantes ou moins douloureuses pour l'animal venaient à être mises au point après le début de ce projet, une

concertation avec la SBEA de l'institut pourra être réalisée afin d'intégrer ces nouvelles pratiques dans nos procédures.

15158 Le foie est un organe vital qui permet le maintien de l'homéostasie de l'organisme. Il est le siège de maladies qui sont provoquées majoritairement par des virus, des toxiques, des expositions régulières à l'alcool. L'augmentation croissante de l'obésité liée à une alimentation riche en sucres et en graisses associée à la sédentarité contribue au développement de maladies du foie. En effet, une alimentation riche en graisses et hydrates de carbone favorise le développement d'une maladie stéatosique non alcoolique du foie ou Non-Alcoholic Fatty Liver (NAFL). Elle peut évoluer sous une forme plus grave appelée stéato-hépatite ou Non-Alcoholic SteatoHepatitis (NASH), caractérisée par une inflammation du tissu hépatique, qui provoque des dommages et favorise l'apparition d'une cirrhose et plus tardivement l'émergence d'un cancer du foie (carcinome hépatocellulaire, CHC).

Ce cancer très grave dépourvu de traitement est à l'heure actuelle la 2ème cause de mortalité par cancer dans le monde. Les mécanismes moléculaires déterminant la progression de la NASH vers un cancer du foie restent encore mal compris et représentent un enjeu majeur de santé publique. Des études récentes ont montré que le développement du CHC était intimement lié à un contexte d'altérations génétiques, métaboliques et inflammatoires favorisant un remaniement du cycle de division de l'hépatocyte.

Dans ce cadre notre équipe s'intéresse à décrypter les mécanismes cellulaires et moléculaires régulant le cycle de division des hépatocytes pour assurer ainsi le maintien de l'intégrité du tissu hépatique. Nous nous intéressons plus particulièrement aux conséquences de la perte d'expression de différents gènes clés, retrouvés mutés dans le CHC humain, sur la division des hépatocytes. Nous cherchons à comprendre les interactions des hépatocytes avec les cellules de l'immunité pour pouvoir déterminer de nouvelles stratégies de traitement des maladies du foie.

Pour répondre à ces questions, nous utiliserons plusieurs lignées de souris génétiquement modifiées et le nombre de souris utilisées sera d'au maximum 900.

Les procédures expérimentales mises en jeu dans ce projet respecteront les exigences de remplacement, réduction et raffinement d'une part, car elles ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants (nécessité d'un organisme entier, vivant, proche de l'homme) et d'autre part, les groupes seront constitués du minimum d'animaux nécessaire et suffisant pour permettre une analyse statistique robuste des effets observés. Nous pourrions être amenés à manipuler moins de souris si l'effet observé s'avère significatif au cours des premières expériences. L'étude sera arrêtée si l'expérience initiale invalide l'hypothèse de travail.

Les animaux sont observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être. Les souris sont placées dans des conditions optimales (température, hygrométrie, cycle jour nuit 12h/12h, enrichissement des cages, nourriture ad libitum). Les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux. Toute manipulation invasive (injection intra-orbitaire) sera précédée d'une courte anesthésie générale (mélange gazeux d'O₂-Isoflurane [0.5-2.5%]). La mise en place d'une grille de suivi strict des points limites permettra d'éviter au maximum le stress et/ou la douleur au cours de l'expérimentation. Dans le cas où un point limite est atteint avant la fin de l'expérimentation, la mise à mort anticipée de l'animal sera faite. Enfin une veille scientifique continue sera effectuée, évitant ainsi toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature.

Ainsi, les résultats de notre projet permettront de déterminer les mécanismes par lesquels l'hépatocyte assure le maintien de l'intégrité du génome, lors des maladies métaboliques et inflammatoires conduisant au développement d'un cancer du foie. Les retombées de nos travaux devraient conduire à élaborer chez l'Homme de nouveaux outils diagnostic/pronostic et des stratégies thérapeutiques innovantes pour ce cancer grave sans traitement effectif.

15159 L'Anévrisme de l'Aorte Abdominale (AAA), qui est caractérisé par une dilatation progressive de l'aorte, représente une cause de mortalité importante puisqu'il touche 5 à 10 % des sujets âgés de

plus de 65 ans. Aucun traitement pharmacologique n'est disponible à ce jour, la chirurgie restant la seule approche thérapeutique validée. L'enjeu actuel est donc de développer des approches pharmacologiques permettant de limiter la progression et de prévenir la rupture de l'aorte, souvent fatale.

Notre projet a pour but de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu dans l'AAA, et plus particulièrement d'étudier l'effet de la modulation de la réponse inflammatoire sur le développement de cette pathologie. Seule l'expérimentation *in vivo*, qui mime de façon fidèle la complexité de la réponse inflammatoire dans le contexte de l'AAA nous permettra de mettre en lumière des acteurs clés impliqués dans la pathogenèse de cette maladie. Pour cela, nous évaluerons la mobilisation de cellules inflammatoires dans différents compartiments tissulaires et à différents temps, ainsi que l'effet sur la dégradation et le remodelage de la matrice extracellulaire de la paroi aortique, suite à la modulation de certains acteurs de la réponse immunitaire innée.

Nous utiliserons deux modèles murins expérimentaux d'induction d'AAA, qui consistent en l'infusion continue d'Angiotensine II via l'implantation sous-cutanée de mini-pompes osmotiques, chez des souris hypercholestérolémiques dans le premier modèle, et chez des souris normocholestérolémiques dans le second, en association avec des injections intra-péritonéales d'anticorps anti-TGFβ. Nous étudierons l'effet de la modulation génétique et pharmacologique de la réponse immunitaire innée en utilisant des modèles de souris déficientes pour notre gène d'intérêt, ou en réalisant des injections intrapéritonéales d'inhibiteurs ou d'anticorps stimulant. Nous analyserons également l'effet de la neutralisation de certaines populations cellulaires, par injections intrapéritonéales d'anticorps neutralisant. La pose de mini-pompes osmotiques sera réalisée sous anesthésie gazeuse, et sera précédée et suivie d'une antalgie appropriée. Un prélèvement de sang sera réalisé sous anesthésie gazeuse avant l'implantation et les animaux seront sacrifiés à différents temps après l'implantation des pompes.

Cette étude, prévue sur 5 ans, nécessitera au total 1960 souris.

Les différentes procédures expérimentales ont été pensées et élaborées afin d'utiliser le moins d'animaux possible tout en permettant d'obtenir des résultats statistiquement satisfaisants. Les paramètres expérimentaux ont été établis lors de projets antérieurs, et permettent de minimiser le nombre d'animaux utilisés. Nous nous attacherons à réduire au maximum la souffrance des souris, par une surveillance quotidienne des animaux. Nous avons défini les paramètres physiques et comportementaux à surveiller, et les attitudes à adopter en fonction de chaque situation, et ainsi décidé de points limites. Un niveau de douleur trop élevé entraînerait l'exclusion du protocole et la mise à mort anticipée de l'animal.

Les résultats de ce projet nous permettront de comprendre, *in vivo*, les mécanismes impliqués dans la régulation de la réponse inflammatoire, et la participation de différents types cellulaires dans le développement de l'AAA.

15160 Le test de toxicité anormale sur rongeurs (souris ou cobayes ou souris et cobayes) est décrit dans les Pharmacopées, qui sont les référentiels pharmaceutiques pour la réalisation des tests de contrôle qualité.

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

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

-Administration du produit pharmaceutique aux animaux, selon la voie et le volume décrits dans le dossier d'AMM (autorisation de mise sur le marché) du produit.

-Observation des animaux pendant la durée prescrite dans le dossier d'AMM (en fonction des Pharmacopées ou des demandes réglementaires).

Les animaux sont hébergés en groupes sociaux pendant toute la durée du protocole. Les souris disposent d'un enrichissement de type enviro-dri, il s'agit d'une litière pour rongeurs spécialement conçue pour améliorer l'activité de construction de nids afin de pouvoir se cacher. Les cobayes disposent d'un enrichissement de type tunnel afin de pouvoir se distraire et se cacher.

Une observation quotidienne est réalisée elle consiste à vérifier l'état clinique des animaux, leur alimentation et leur boisson. En cas de point limite observé, l'animal est euthanasié.

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

-Il n'existe pas aujourd'hui d'équivalent *in vitro* du test de toxicité anormale.

-Il s'agit d'un test réglementaire, obligatoire à partir du moment où il est enregistré dans le dossier d'AMM du produit.

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

Le nombre d'animaux prévu pour 345 tests (= nombre de produits) à réaliser est d'environ 1250 souris par an et de 410 cobayes par an soit un total de 6250 souris et 2050 cobayes pour la durée totale du projet.

15161 Les maladies du système nerveux (Alzheimer, Parkinson, Huntington...) et les autres altérations cérébrales liées à l'âge sont une préoccupation croissante en santé publique. La maladie d'Alzheimer (MA) est une affection neurodégénérative caractérisée par l'accumulation cérébrale de plaques amyloïdes contenant des peptides β -amyloïdes ($A\beta$).

Nous souhaitons progresser dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques de la MA. Depuis quelques années, plusieurs scientifiques ont montré que l'inoculation intracérébrale de tissus contenant des peptides $A\beta$ dans des modèles souris accélère le développement et la propagation de ces peptides (pathologie appelée « amyloïdose ») chez l'hôte receveur. Chez l'homme, l'administration d'hormone de croissance ou de greffe de dure-mère issus d'échantillons contaminés par des peptides amyloïdes induit une amyloïdose cérébrale. L'apparition de cette pathologie s'explique par la capacité de ces peptides à interagir entre eux et à induire des changements de conformation qui amplifient les lésions $A\beta$ et permettent leur propagation dans tout le cerveau. Les peptides $A\beta$ se différencient par des variations au niveau de leur structure protéique. L'impact de ces variants sur la pathologie Alzheimer est cependant encore inconnu.

Notre étude vise à mieux comprendre l'action pathologique de divers variants d' $A\beta$. Nous développerons des souches de peptides présentant des caractéristiques très différentes et évaluerons leur influence *in vitro* sur des modèles cellulaires et *ex vivo*. Ces différents peptides seront ensuite inoculés, par chirurgie intracérébrale, dans des souris modèles de la MA anesthésiées et prises en charge au niveau analgésique. Les modèles animaux seront suivis sur un mode longitudinal atteintes comportementales, atteintes fonctionnelles observables en IRM fonctionnelle, atrophie cérébrale, réorganisation de l'amyloïde dans le fluide interstitiel, charge amyloïde plasmatique. Ensuite, nous étudierons par biochimie et immunohistochimie les différentes altérations induites par l'inoculation des variants de peptides $A\beta$ dans ces modèles 1, 4 ou 8 mois post-inoculation. Enfin, nous évaluerons si les peptides $A\beta$ issus du cerveau des souris inoculées induisent des altérations sur les modèles cellulaires évalués dans la première partie de l'étude et lors d'un 2ème passage sur souris selon le même procédé chirurgical. Cela permettra d'évaluer s'ils ont conservé leurs caractéristiques pathologiques initiales (effet de souche).

Ce projet permettra donc d'identifier l'importance des effets souches sur les altérations fonctionnelles de la MA, d'évaluer l'importance de leur transmissibilité et d'identifier des acteurs moléculaires responsables de la propagation de la pathologie et de cet effet de souche.

La MA est également un facteur de risque qui accroît la probabilité de survenue de l'épilepsie et les crises d'épilepsie sont avérées chez les patients souffrant de la maladie d'Alzheimer. Plusieurs études ont démontré la survenue de crises d'épilepsie chez les souris transgéniques modèles de la MA et suite à des études préliminaires, nous suspectons que différents variants de peptides A β modulent différemment l'apparition de crises d'épilepsie chez des souris. L'utilisation d'un traitement épiléptogène ou d'un traitement anti-épiléptique permettra de déterminer respectivement si les variants inoculés augmentent la vulnérabilité des animaux face à l'épilepsie (déclenchement plus précoce d'une crise d'épilepsie après administration d'un agent épiléptogène) et si l'épilepsie a un rôle dans la mortalité et les atteintes cognitives des animaux qui ont reçus des variants d'amyloïde (notre hypothèse est que des thérapies contre l'épilepsie améliore la survie et la cognition de ces souris).

Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet, nés et élevés en captivité, proviennent de notre élevage interne. Le projet prévoit l'utilisation de 750 souris. Ces effectifs ont été réduits au minimum nécessaire pour garantir la validité statistique des résultats.

Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis et validés pour les rongeurs depuis de nombreuses années, et validés par un vétérinaire. L'application de critères d'arrêts standards en élevage et le suivi quotidien des animaux, hébergés en groupe dans un milieu enrichi garantissent leur bien-être.

15162 L'objectif de ce projet est d'identifier les comportements moteurs impliquant les neurones du cortex qui communiquent directement avec la moelle épinière (corticospinaux) lombaire et sont impliqués dans le contrôle des pattes postérieures de la souris. A terme, nous souhaitons étudier comment s'organise la transmission de l'information motrice du cortex moteur vers différentes structures sous corticales, dont la moelle épinière, pour l'exécution du mouvement. Les données de cette étude permettraient d'apporter des précisions aux différents modèles de la commande motrice proposés actuellement.

La fonction des neurones corticospinaux a déjà été mise en évidence pour la motricité des pattes antérieures, dans le cadre de mouvements complexes, tels que la préhension d'objet. Cependant, les connaissances pour les pattes postérieures sont bien plus limitées, les seules études réalisées n'ayant étudié que des comportements de locomotion basique.

Ainsi, les expériences seront réalisées sur des souris, qui subiront une ablation des neurones corticospinaux et réaliseront des tâches de motricité, afin de mettre en évidence des altérations dans l'exécution de mouvements locomoteurs complexes. Au vu des données bibliographiques, ces effets n'auront pas d'incidence sur le comportement locomoteur basique des animaux, et nous émettons l'hypothèse que les effets sur la locomotion complexe seront subtils.

Au total, le projet utilisera au maximum 128 souris

Dans notre approche, le modèle animal ne peut être substitué par une approche *in vitro* ou *in silico*, car nous souhaitons étudier le réseau neuronal dans son intégralité ainsi qu'en regard des effets comportementaux sur la motricité. De plus, les connaissances sur l'activité de ce circuit sont encore trop limitées pour permettre des modélisations fiables.

Nous nous sommes assurés de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés, en calculant et prévoyant d'utiliser le nombre d'animaux minimum pour avoir des données statistiquement significatives. D'autre part, les approches expérimentales ont été raffinées en utilisant des conditions d'hébergement adaptées, avec enrichissement (matériel de nidification, bâton à ronger) en utilisant des anesthésies adaptées en contrôlant de façon permanente le bien-être animal en établissant des points limites.

Ce projet a donc pour but de clarifier l'impact de la perte des neurones corticospinaux sur la motricité fine des pattes postérieures. Ces données nous permettront d'identifier les comportements moteurs pertinents afin d'orienter la suite de nos études sur l'organisation du circuit de la transmission de

l'ordre moteur entre le cortex et la moelle épinière. Ces informations sont essentielles pour l'évolution des modèles admis aujourd'hui, ainsi que pour la recherche thérapeutique de différentes pathologies dans lesquelles ce circuit peut être atteint (scléroses, traumatismes médullaires...)

15163 La transplantation rénale est la meilleure alternative à l'insuffisance rénale terminale. Cependant, le nombre croissant de patients en attente de greffe a conduit les équipes de transplantation à élargir les critères de sélection aux donneurs présentant des facteurs de comorbidités (Donneurs à critères étendus et donneurs décédés après arrêt circulatoire). Les greffons, issus de ces donneurs, sont très sensibles et présentent ainsi un risque accru de dysfonctions du greffon après transplantation. L'hypothèse d'une thérapie régénératrice/réparatrice, via l'utilisation de cellules souches ou dérivés de ces cellules, semble une stratégie judicieuse afin de réparer le tissu greffé lésé. Ainsi, nous proposons le développement d'une nouvelle stratégie de thérapie cellulaire à partir de cellules souches issues d'urine pour améliorer la reprise de fonction après transplantation rénale. Les cellules souches issues d'urine ont la capacité de se différencier en cellules rénales, ce qui représente un réel avantage dans notre étude puisque notre hypothèse est qu'elles peuvent contribuer de façon significative à la régénération rénale post-greffe. Notre objectif principal est de tester l'effet d'une injection de cellules souches d'urine, ou de dérivés de ces cellules, dans un modèle préclinique porcin de transplantation rénale. Pour ce projet nous utiliserons 49 animaux (porcs Large White mâles âgés de 3 mois) pour la transplantation. La règle des 3 R a été prise en compte : 1) Ce processus expérimental ne peut être remplacé par un protocole *in vitro*. Seul un protocole *in vivo* peut reproduire la complexité des mécanismes physiologiques impliqués lors de la transplantation chez l'homme. 2) Le nombre d'animaux par groupe est réduit au maximum, justifié par un test de puissance pour définir le nombre d'animaux par groupe, suffisant pour détecter des différences statistiques biologiques et histologiques entre les groupes. 3) Le raffinement de cette étude a également été pris en compte, les animaux seront hébergés dans des locaux adaptés à proximité de leurs congénères permettant de les voir et de les sentir, avec enrichissement des box adapté à l'espèce afin d'éviter l'ennui. De plus les traitements anesthésiques et analgésiques ont été mis au point par des médecins anesthésistes réanimateurs dans le but de réduire la souffrance des animaux.

15164 Le rôle de défense de l'intestin contre des agents pathogènes du milieu extérieur est complexe et implique un dialogue constant entre différents acteurs les cellules de l'intestin, le microbiote et les cellules du système immunitaire. Le microbiote intestinal, composé de l'ensemble des micro-organismes de la lumière du tube digestif, joue un rôle dans les fonctions digestive, métabolique, immunitaire ou encore neurologique. Par conséquent, une dysbiose, c'est-à-dire un déséquilibre de la composition du microbiote, observée dans de nombreuses maladies, est une piste intéressante pour comprendre l'origine de certaines pathologies.

Des perturbations des mécanismes de défense de l'intestin exposent à des réactions allergiques ou inflammatoires. Ainsi, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, comme la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique, se caractérisent par une inflammation de la paroi de l'intestin due à une stimulation du système immunitaire, ce qui constitue un facteur de risque du cancer colorectal. En plus de facteurs génétiques et environnementaux, la dysbiose semble impliquée dans l'initiation de l'inflammation, mais les mécanismes mis en jeu restent à élucider.

Nous avons montré que les cellules tuft, qui ont un rôle de sentinelles contre des infections parasitaires ou bactériennes, sont capables de sentir les signaux d'un microbiote dysbiotique et d'induire en retour une inflammation chronique. Les cellules tuft jouent donc un rôle clé dans l'initiation de l'inflammation intestinale consécutive à une dysbiose et participent à la formation d'un cercle vicieux. Les objectifs principaux de ce projet sont d'identifier les composants du microbiote dysbiotique qui sont reconnus par les cellules tuft et les voies de signalisation mises en jeu par ces dernières afin d'induire une inflammation. Ce projet permettra de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans une dysbiose et l'initiation d'une inflammation chronique intestinale.

Ce projet requiert une analyse intégrée des communications qui existent entre l'épithélium intestinal, les cellules du système immunitaire et le microbiote. Cette approche de physiologie intégrative sera menée à l'aide de modèles de souris conduisant à l'inactivation de Sox9 dans les cellules de l'épithélium intestinal chez l'adulte, associée à l'inactivation de différents gènes candidats impliqués dans diverses voies de signalisation des cellules tuft. Nous utiliserons 5 lignées de souris transgéniques, soit un total d'animaux estimé à 520 souris, sur une durée totale de projet de 5 années. Notre démarche s'inscrit dans le respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 (« règle des 3R ») 1/ Remplacement le modèle de cultures organotypiques primaires d'épithélium intestinal dérivées des différents modèles murins sera utilisé dans la mesure du possible pour disséquer les mécanismes moléculaires et cellulaires régulés par Sox9, dans le but de remplacer et limiter le nombre d'animaux utilisés 2/ Réduction le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis afin d'obtenir des résultats statistiquement interprétables. La majorité des animaux produits dans les lignées seront utilisés (études menées sur les mâles et femelles, la plupart des génotypes produits seront utilisés) 3/ Raffinement les animaux feront l'objet d'une surveillance régulière par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié de l'animalerie. Afin de réduire au maximum la douleur et l'angoisse que certains protocoles pourraient engendrer chez les animaux, des points limites ont été définis. En cas de signes de détresse ou de douleur, d'atteinte d'un point limite, en accord avec le personnel qualifié, le protocole sera stoppé pour ces animaux qui seront euthanasiés et autopsiés. Tous les animaux auront à leur disposition de la boisson et de la nourriture à volonté, et leur milieu sera enrichi à l'aide de carrés de coton pour la construction d'un nid, ainsi que de litière mélangée à des copeaux.

15165 Le cancer est la deuxième cause de décès dans les pays développés après les maladies cardiovasculaires. Les traitements conventionnels de nombreux cancers tels que la radiothérapie, la chimiothérapie et la chirurgie ont démontré des limites d'efficacité nécessitant un besoin urgent de nouvelles stratégies thérapeutiques. Les virus oncolytiques sont une nouvelle classe d'agent thérapeutique pouvant être une alternative au traitement des cancers. Par définition, un virus oncolytique est un virus qui démontre une réplication et une destruction spécifique des cellules tumorales avec une faible voire aucune cytotoxicité sur les tissus dits « sains ». La perspective de ce projet est d'évaluer dans différents modèles murins de cancers, l'efficacité thérapeutique d'un virus oncolytique combiné avec un ou plusieurs siRNA (acide nucléique qui permet d'éteindre spécifiquement un gène). Les cancers ciblés correspondent aux tumeurs pour lesquelles il y a un fort besoin médical en clinique humaine. Sachant que le développement clinique des virus oncolytiques prévoit de les combiner avec d'autres traitements afin de potentialiser leur activité anti-tumorale, le projet se propose d'explorer dans les modèles murins la combinaison d'un virus oncolytique avec un ou plusieurs siRNA. Les résultats issus de ce projet permettront une meilleure compréhension des mécanismes d'activité des virus oncolytiques et permettra d'évaluer le potentiel thérapeutique de l'association d'un virus de la vaccine avec des siRNA.

Pour les expériences que nous mènerons nous serons vigilants à mettre en œuvre la règle des 3R -Réduire le nombre de souris utilisées avant d'être testés chez l'animal, les siRNA auront été évalués *in vitro* sur des modèles cellulaires de tumeurs humaines et murines établies et caractérisées afin de sélectionner les siRNA permettant d'inhiber spécifiquement l'expression des gènes d'intérêt de la manière la plus efficace et ne présentant pas de cytotoxicité. Nous prévoyons de mesurer l'effet bénéfique que pourrait apporter une association de siRNA afin de potentialiser l'effet oncolytique de notre virus de la vaccine. Différents tests statistiques seront appliqués (notamment les tests Mann Whitney et Log-Rank) afin de réduire au maximum le nombre d'animaux nécessaire à la réalisation de cette étude. Notre service de biostatistique a déterminé que l'obtention de résultats statistiquement robustes nécessite des groupes de 15 animaux.

-Remplacer du fait de l'absence de système *in vitro* comportant tous les éléments pouvant interférer avec la réplication virale, et permettant de mimer leurs interactions et leur mode d'action, l'emploi de modèles animaux est incontournable. Un nombre maximal de 560 souris (immuno compétentes) est envisagé pour ce projet.

-Raffiner Tout au long de leur vie, une attention particulière est portée au bien-être des animaux en particulier par un enrichissement de leur milieu de vie qui leur permet d'assouvir les comportements liés à leur espèce. Les animaux sont hébergés en groupes sociaux pendant toute la durée des expérimentations, dans le but de préserver les interactions sociales entre congénères, avec eau et nourriture ad libitum. La réalisation par des techniciens rompus à ses manipulations garantissent la bonne reproductibilité des expériences et un suivi optimal du bien-être des animaux. Les effets dus au traitement seront surveillés et des critères d'interruption de l'expérimentation en fonction de l'aspect clinique des animaux (grille de score évaluant le volume tumoral, l'apparence de la tumeur, l'évolution pondérale, l'apparence physique général, le comportement) sont mis en place afin de limiter le stress et la souffrance des animaux.

15166 La flore intestinale (ou microbiote) joue un rôle majeur dans la santé humaine. Au-delà de la digestion, les bactéries commensales de l'intestin contribuent à une bonne santé générale, et notamment immunitaire. Il a été montré récemment que la présence de certaines espèces bactériennes était bénéfique pour la réponse à la chimiothérapie, et aux immunothérapies par anticorps, notamment dans le mélanome. Parmi les nombreuses stratégies d'immunothérapies disponibles pour traiter un cancer, la vaccination thérapeutique est une option tout à fait intéressante et qui peut de surcroît être combinée aux traitements par anticorps pour augmenter l'efficacité thérapeutique. L'impact de la flore sur la réponse à la vaccination n'a jamais été étudié. Ce projet vise donc à caractériser l'impact de la flore sur la réponse vaccinale anti-cancéreuse, et à identifier la ou les espèces bactériennes qui doivent nécessairement être présentes, et en nombre suffisant, pour que le patient soit répondeur à la vaccination. Pour cela nous allons étudier la réponse à la vaccination de souris conventionnelles ou préalablement traitées aux antibiotiques (pour éliminer la flore intestinale) ainsi que la réponse anti-tumorale induite sur des souris porteuses de tumeurs de mélanome (ayant ou non une flore bactérienne). Ceci démontrera que la flore est bien nécessaire à une bonne réponse à la vaccination et donc à l'élaboration d'une réponse immunitaire anti-tumorale efficace. Dans un second temps, nous analyserons la composition de la flore bactérienne sur des souris conventionnelles vaccinées. Ainsi, nous comparerons les flores des souris répondeuses et non répondeuses et chercherons à identifier les espèces bactériennes présentes uniquement dans la flore des souris répondeuses.

La découverte de bonnes bactéries permettra d'envisager des « pré-conditionnements » des patients par traitement par pré- ou pro-biotiques, qui favoriseront le développement de ces bonnes bactéries au niveau de la flore pour permettre une bonne réponse à la vaccination et aux immunothérapies. Nous avons développé des prébiotiques et des probiotiques aidant au développement de « bonnes » bactéries que nous évaluerons également dans cette étude.

Ce projet nécessite au total 3240 souris dont 2592 souris en condition de vaccination anti-tumorale et 648 saines. Ce projet a été conçu dans le respect de la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). En effet, tout d'abord, ce type d'étude ne peut être réalisée *in vitro*. Seul un organisme vivant permet d'étudier les interactions entre la flore commensale et le système immunitaire, nous ne pouvons donc pas Remplacer ce modèle d'étude. Nous avons également Réduit au maximum le nombre d'animaux par groupe et le nombre de groupes, et également cherché à optimiser les expériences pour obtenir un maximum de réponses tout en utilisant un minimum d'animaux. Le nombre de souris par groupe ne peut être davantage réduit, afin de permettre l'obtention de résultats statistiquement fiables. Enfin, en termes de Raffinement, les animaux seront élevés et hébergés en groupe avec enrichissement du milieu de vie. Un suivi quotidien du bien-être des animaux sera réalisé.

15167 Ce projet a pour but d'étudier les interactions entre deux troubles psychiques très fréquemment comorbides les addictions et l'état de stress post-traumatique (ESPT). En clinique, la prévalence de l'addiction dans la population souffrant d'ESPT est en effet importante, et, inversement, il a été suggéré que les patients souffrant d'addiction sont plus à risque d'être fortement impactés par un événement traumatisant. L'un des symptômes majeurs de l'ESPT est l'incapacité à éteindre les

mémoires de peur. Les addictions et l'état de stress post-traumatique sont des maladies complexes dont les symptômes physiologiques et comportementaux ne peuvent être étudiés qu'avec l'animal. L'objectif du projet est donc de modéliser en préclinique chez la souris la prédisposition au développement de troubles du stress dans un contexte d'addiction à différentes drogues (cocaïne, morphine, éthanol, métamphétamine), et inversement d'établir un modèle de prédisposition à l'addiction à ces drogues à la suite d'un stress. Ces interactions seront recherchées en relation avec l'évaluation de l'inflammation du cerveau provoquée soit par l'abus de drogues soit par une mémoire de peur persistante. Le but à long terme est de proposer des stratégies thérapeutiques, notamment anti-inflammatoires, qui seraient communes aux désordres d'addictions et de stress.

L'addiction sera modélisée par une auto-administration orale des drogues et par le modèle de préférence de place conditionnée par ces drogues. Dans ce modèle, une association positive est créée entre l'un des deux compartiments d'une cage et l'administration d'une drogue. Les mémoires de stress seront examinés dans le modèle du conditionnement de la peur dans lequel un stimulus neutre (de 30s) est associé à un stimulus aversif (d'une durée de 2s) l'association se faite à 6 reprises espacées de 2 minutes. D'autres tests comportementaux seront également réalisés afin d'évaluer l'état d'anxiété des animaux.

Dans une première partie du projet, une addiction à différentes drogues sera induite chez la souris et les éventuels désordres de stress seront évalués chez ces animaux. Dans une deuxième partie du projet, les souris seront exposées au stress de conditionnement de la peur, et l'auto-administration per os de drogues et la préférence de place conditionnée par différentes drogues seront évaluées.

A la suite des études comportementales, un échantillon sanguin ainsi que les cerveaux seront prélevés après euthanasie de l'animal, afin d'étudier des marqueurs inflammatoires. Les études seront réalisées sur un nombre total de 2276 souris pour une durée de 5 ans.

Les différentes procédures expérimentales ont été élaborées afin d'utiliser le moins d'animaux possible tout en permettant d'obtenir des résultats statistiquement satisfaisants. Les modèles expérimentaux qui seront utilisés sont très reproductibles et n'entraînent aucune mortalité. Ces modèles de conditionnement classiques sont très pertinents et robustes, ce qui réduit le nombre d'animaux nécessaires.

L'angoisse des animaux sera minimisée par au moins une semaine d'habituation aux conditions d'hébergement avant le début des expériences. L'auto-administration de drogues per os oblige à héberger les souris en cages individuelles pour pouvoir mesurer les consommations individuelles cependant leur environnement sera enrichi par mise à disposition de nids végétaux, ce qui contribue à réduire l'angoisse des animaux. Pour le modèle de la peur conditionnée, quoique ce modèle soit stressant pour l'animal, il est de courte durée et ne produit pas de lésions physiques. Les animaux seront observés quotidiennement afin de relever toute modification majeure de leur état général et/ou de leur comportement. Ils seront également pesés lors de l'administration de drogue et/ou au moins une fois par semaine. Des points limites reposants sur des critères de comportement, d'apparence et de perte de poids ont été établis. L'atteinte de l'un de ces points limites entraînera la mise à mort anticipée de l'animal.

A terme, les résultats de ce projet permettront de mieux comprendre les mécanismes communs aux addictions et à l'ESPT. In fine, ceci permettra de développer des stratégies thérapeutiques pour la prise en charge de ces comorbidités chez les patients souffrant de ces deux pathologies.

15168 L'anxiété affecte 15-25% de la population dans les pays développés et constitue un problème majeur de santé publique. Parmi les médicaments les plus fréquemment utilisés, on peut citer Valium, Prozac, Buspar et Zoloft.

Cependant ces traitements présentent des effets secondaires majeurs. Par exemple, le Valium entraîne des troubles de la mémoire, une somnolence, une addiction ainsi qu'un syndrome de sevrage. Ainsi, la recherche de nouveaux médicaments sans les effets notoires des anxiolytiques actuels reste un défi.

Les modèles d'anxiété basés sur l'analyse du comportement de rats demeurent à l'heure actuelle les plus pertinents et les seuls validés par la communauté scientifique. Ces modèles ont permis d'étudier les mécanismes physiopathologiques des troubles anxieux et permettent ainsi de développer de nouveaux traitements, pharmacologiques ou comportementaux. Remplacer Bien qu'il soit possible de disséquer les mécanismes d'action des nouveaux médicaments *in vitro*, les réponses comportementales des animaux induites par ces nouveaux traitements sont des événements difficiles à simuler et à prédire par des expériences *in vitro*. De plus, ces expérimentations permettent de faire un lien avec une éventuelle application clinique. Elles sont ainsi incontournables avant une étude clinique et ne peuvent être remplacées par des expérimentations *in vitro*.

Raffinement le bien-être des animaux est primordial durant les expérimentations. Ainsi, un certain nombre de mesures sont mis en œuvre; notamment une inclusion de phase d'acclimatation (environ 1 semaine) avant toute expérimentation, des conditions d'hébergement appropriées (maintien des animaux en groupe sociaux, respect de l'espace minimum pour chaque animal, accès à l'eau et à la nourriture à volonté), une visite quotidienne, une gestion de la douleur et de la souffrance suivant une échelle stricte et des points limites bien établis. Réduire nous cherchons toujours un compromis expérimental qui permette de réduire le nombre d'animaux utilisés. Par exemple, nous favorisons le test de plusieurs conditions expérimentales en parallèle (jusqu'à 10 groupes expérimentaux) afin de ne pas multiplier les groupes témoins.

En règle générale, chaque groupe expérimental d'un plan d'étude comporte 12 animaux afin d'obtenir un résultat statistiquement fiable et évite ainsi la répétition d'expériences. Nous pensons étudier une trentaine de molécules par an et donc sur une période de 5 ans l'utilisation de 9000 rats est envisagée.

15169 Les effets de l'exercice physique sur l'immunité ont largement été étudiés chez le sujet sportif. Lors d'une séance d'exercice physique intense ou d'endurance, la production de cellules, comme les lymphocytes, augmente très rapidement et cela contribue à une inflammation et un stress oxydant systémique et musculaire. Plusieurs études ont démontré que la pratique sportive exagérée peut affaiblir les réponses immunitaires face aux infections, notamment respiratoires, mais peu de données sont disponibles sur les liens physiologiques entre exercice et immunité. Le facteur de transcription Nrf2 est connu pour son rôle majeur dans la régulation des réponses antioxydantes et anti-inflammatoires. L'activation de la voie Nrf2 par un agent pharmacologique comme le sulforaphane (SFN) est utilisée pour lutter contre le stress oxydant et l'inflammation. L'objectif du projet de recherche est d'étudier l'effet d'un traitement de 2 jours avec SFN (par voie orale) sur l'inflammation systémique et musculaire à 2 jours d'exercice physique d'endurance (sur tapis roulant) chez la souris C57BL/6J.

Pour cette étude, il est nécessaire d'utiliser des animaux vivants. L'espèce choisie est la souris C57BL/6J. Dans le respect de la règle des 3R (réduction, raffinement, remplacement), nous utiliserons un nombre adéquat de sujets sauvages, soit un total de 120 souris. Pour le remplacement, cette espèce est capable de courir sur un tapis roulant et sera utile pour l'étude du rôle de l'exercice physique d'endurance sur l'inflammation et le stress oxydatif systémique et musculaire. Pour la réduction, un nombre adéquat d'animaux minimum sera utilisé pour atteindre des résultats statistiquement significatifs. Pour le raffinement, les animaux seront hébergés au maximum 5 souris par cage et des enrichissements seront ajoutés. Pour limiter le stress des animaux en exercice physique d'endurance, nous utiliserons le refus de course comme un point limite pour arrêter le protocole. Ce projet permettra une meilleure compréhension physiologique de l'effet de la voie de signalisation Nrf2 sur l'inflammation et le stress oxydant lors de l'exercice chez la souris.

15170 L'inflammation est une réaction développée par l'organisme pour se protéger des agressions externes (infections par exemple) ou internes (cellules cancéreuses). Ce phénomène, qui repose majoritairement sur le système immunitaire, est indispensable car il permet l'élimination des « intrus » et la réparation des tissus endommagés. Cependant il arrive dans certains cas que cette

inflammation ne soit plus contrôlée et qu'elle perdure dans le temps on parle alors d'inflammation chronique.

Si cette inflammation n'est pas identifiée et contrôlée, elle peut mener au développement de pathologies. Par exemple, la recherche a mis en évidence qu'une inflammation chronique, présente dans tout l'organisme se développe naturellement chez les individus âgés. Si les causes sont encore peu connues, il est clairement établi que cette inflammation chronique « physiologique » est associée à une augmentation des risques de développer des maladies, notamment cardiovasculaires et neurodégénératives.

L'inflammation chronique peut également être provoquée, c'est par exemple une cause identifiée à l'origine de la maladie du diabète de type 2. Dans ce cas, c'est une alimentation trop riche associée à un manque d'activité physique qui provoque une surcharge de graisse dans le tissu adipeux. Cette surcharge va causer un stress dans les cellules chargées de stocker le gras – les adipocytes – qui va attirer le système immunitaire à l'origine de l'inflammation.

Le système immunitaire peut également être dérégulé et « s'emballer », c'est le cas des maladies auto-immunes. Dans le lupus par exemple, le système immunitaire va fabriquer des anticorps qui vont reconnaître et attaquer les tissus sains, ce qui provoque des épisodes inflammatoires destructeurs et répétés.

Il est donc très important d'identifier des facteurs ou des acteurs capables de réguler l'inflammation et/ou le système immunitaire pour éviter leurs effets destructeurs.

Au laboratoire, nous nous intéressons à une protéine nommée DICER. Elle possède de très nombreuses fonctions qui la rendent indispensable à la survie, la prolifération et la spécialisation des cellules. Nous pensons que cette protéine pourrait avoir un effet primordial sur l'inflammation parce les études sur cette protéine montrent que lorsqu'elle est absente (on parle de Knock Out ou KO)

-Certains types de cellules vont exprimer des signaux de stress capables d'activer et de recruter le système immunitaire qui déclenche une réaction inflammatoire;

-D'autres type de cellules vont adopter un comportement inflammatoire, c'est-à-dire qu'elles vont exprimer des molécules et des signaux qui participent à la réaction inflammatoire;

-Enfin, certaines cellules du système immunitaire, normalement capable de neutraliser l'inflammation, vont perdre cette fonction de régulation et donc permettre un emballement de la réaction.

Ces études présentent cependant une grande limite elles reposent sur la suppression totale (KO) de l'expression de la protéine DICER, or ce phénomène n'est jamais retrouvé naturellement dans l'organisme. Par contre, l'expression de la protéine DICER est diminuée lors du vieillissement et lors de stress (infections par exemple).

Il est donc nécessaire d'avoir une étude plus proche de la physiologie et de savoir si une diminution de l'expression de DICER conduit aux mêmes phénomènes délétères que ceux observés dans les études de KO.

Nous possédons au laboratoire un modèle de souris portant une mutation « hypomorphe » sur le gène DICER, c'est-à-dire que la protéine va être exprimée mais en très petite quantité. Cette mutation permet d'obtenir des animaux viables qui permettront de savoir si une diminution de DICER peut provoquer une dérégulation de l'inflammation et être à l'origine de pathologies.

Le projet utilisera au maximum 481 souris. L'objectif est de maintenir la lignée génétiquement modifiée et de mesurer des marqueurs de l'inflammation chez des animaux jeunes et âgés, chez des souris soumises à un régime gras et sucré ou encore soumise à un lupus induit; ceci tout en observant au maximum la règle des "3R"

Réduire Le nombre d'animaux nécessaire a été estimé au minimum mais néanmoins suffisant pour réaliser des analyses statistiques pertinente. Une étude exhaustive des données récentes de la littérature n'a pas permis d'identifier une équipe réalisant des expériences sur un modèle animal ou cellulaire similaire.

Raffiner Le protocole expérimental prend en compte un potentiel impact sur la souffrance animale et des points limites spécifiques ont été déterminés pour chaque procédure afin d'éviter toute souffrance animale et justifier un arrêt de l'expérience en cours. Les procédures sont réalisées au maximum sous anesthésie ou après mise à mort et le suivi des animaux est quotidien (weekend et jours fériés inclus).

Remplacement Les données générées *in vitro* et *in vivo* dans la littérature antérieure n'ont pas permis d'élucider clairement comment une diminution de l'expression de DICER impacte la régulation de l'inflammation. Seul notre modèle animal - couplé au maximum avec des études de culture cellulaire - permettra dans notre cas de répondre à ces questions complexes.

15171 Les maladies auto-immunes inflammatoires du côlon comme la colite ulcéreuse ou la maladie de Crohn sont des maladies chroniques hétérogènes qui affectent plus de 1,3 millions de patients aux Etats-Unis et entre 2,5 et 3 millions en Europe. En France, l'incidence pour la maladie de Crohn est de 8,3 pour 100000 personnes avec une fréquence plus élevée chez des jeunes adultes entre 20 et 30 ans. Le coût pour le traitement et la prise en charge des patients atteint 4,6 à 5,6 milliards euros/an. Ces maladies auto-immunes inflammatoires résultent d'une activation inappropriée du système immunitaire (perte de la tolérance immunologique) qui attaque les cellules intestinales aboutissant à la destruction tissulaire dans une ou plusieurs zones du tube digestif, préférentiellement le côlon, l'intestin grêle et/ou l'anus. La qualité de vie des patients atteints de la maladie de Crohn est largement altérée avec une maladie qui évolue par poussées avec des alternances de phases de rémission. Lors des poussées, les patients souffrent de violentes douleurs abdominales associées à des diarrhées chroniques. Selon l'étendue des lésions inflammatoires, des formes hémorragiques sont observées. Parmi les causes de cette maladie, les facteurs immunologiques, génétiques et environnementaux ont été décrits. Les traitements actuels permettent de réduire les signes cliniques en bloquant l'inflammation. Cependant, un nombre significatif de patients sont ou deviennent résistants à ces approches thérapeutiques, indiquant un réel besoin médical pour la découverte de nouvelles thérapies.

La découverte des populations lymphocytaires T régulatrices (Treg) capables de contrôler les réponses immunitaires et de limiter le développement des maladies auto-immunes a permis d'initier de nouvelles stratégies thérapeutiques. L'efficacité de certaines de ces nouvelles approches, qui consistent à faciliter la prolifération et la survie de ces Tregs ou à transférer des cellules T régulatrices a été testée dans des modèles murins de colite. Dans ces modèles expérimentaux, il a été montré que ces Tregs étaient capables de diminuer l'inflammation et la destruction des muqueuses intestinales chez l'animal.

Afin de rendre cette thérapie encore plus efficace, nous avons modifié génétiquement les cellules T régulatrices. Notre objectif est que ces cellules Tregs génétiquement modifiées puissent agir de manière spécifique et locale au niveau de l'intestin. Nous espérons que ce ciblage précis de l'activité des cellules Tregs permettra de réduire leur toxicité potentielle ainsi que les risques liés à une suppression globale et non spécifique de l'ensemble du système immunitaire (comme par exemple, le risque d'apparition de maladies infectieuses ou de cancers). Afin d'obtenir les données précliniques demandées par les autorités sanitaires pour les premiers tests chez l'humain, nous testerons cette nouvelle thérapie cellulaire dans un modèle de colite chez la souris immuno-déficiente NSG ou NSG-SGM3 et chez la souris C57BL/6, notre modèle animal de référence. Les souris NSG et NSG-SGM3 ont été génétiquement modifiées pour détruire leur système immunitaire. Dans ces souris, il est possible de reconstituer un système immunitaire humain complet en injectant des cellules souches humaines. Ceci permet de tester l'effet thérapeutique des cellules régulatrices humaines sur les cellules pathogéniques humaines et d'obtenir des données scientifiques dans un contexte le plus proche possible de la situation clinique observée chez les patients souffrant de maladie inflammatoire de l'intestin.

Les règles d'expérimentation sont comme suit (Remplacer) l'emploi des modèles *in vivo* est nécessaire au projet car il n'existe pas à l'heure actuelle de méthodes alternatives permettant de reproduire *in vitro* la complexité des mécanismes immunologiques mis en place lors des maladies inflammatoires de l'intestin. (Raffinement) : les souris seront hébergées dans un environnement

respectueux de leur état pathologique. Un accès facilité à la nourriture et à l'eau est prévu (croquettes humidifiées et gel hydrique) dès l'apparition d'animaux affaiblis. En cas de souffrance de l'animal déterminée par la grille des points limites, l'animal sera mis à mort par des méthodes réglementaires. Pour les actes de prélèvement invasifs comme les prélèvements sanguins, nous utiliserons un anesthésique local pour limiter la douleur. (Réduction) Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, chaque groupe contiendra le nombre de souris minimum indispensable à l'obtention de résultats statistiquement significatifs. De plus, seuls les Tregs génétiquement modifiés montrant l'activité désirée *in vitro* seront testés *in vivo* afin de réduire le nombre de souris utilisés. Un nombre total de 3843 souris sera nécessaire.

15172 La maladie de Parkinson est la deuxième des maladies neurodégénératives les plus fréquentes. Malgré cela, les causes sont encore mal connues. Cette maladie est caractérisée par une perte des neurones dopaminergiques de la substance noire. A l'apparition des symptômes moteurs qui permettent de poser le diagnostic, 70 à 80% de ces neurones ont déjà dégénéré. La maladie de Parkinson est aussi caractérisée par des symptômes non-moteurs qui peuvent survenir jusqu'à une décennie avant les symptômes moteurs et qui inclut notamment les troubles du sommeil. Les symptômes non moteurs ont été, jusqu'à ces dernières années, moins étudiés que les symptômes moteurs. Or ils représentent un sujet d'étude primordial pour la compréhension du développement de la maladie de Parkinson.

Le but de notre projet est d'étudier la contribution des neurones dopaminergiques dans l'apparition de troubles du sommeil tels que décrits dans la maladie de Parkinson.

Ce projet sera réalisé dans le respect de la règle des 3R. Afin de réduire le nombre d'animaux, une analyse de puissance a été effectuée, permettant de déterminer que le nombre de souris nécessaires est de 30, incluant les groupes expérimentaux et leurs contrôles. Le remplacement est impossible pour ces expériences qui sont centrées sur l'enregistrement du sommeil, ce qui rend l'utilisation de l'animal entier incontournable. Pour le respect du raffinement, nous nous assurerons que toutes les souffrances liées aux chirurgies seront soulagées par les molécules les plus adaptées; Les tests comportementaux réalisés feront appel au comportement spontané de l'animal sans contention. Le bien-être des animaux sera pris en compte à chaque étape.

15173 Pour comprendre le rôle de certaines cellules dans la réponse inflammatoire ou immunitaire innée, il est parfois possible de retirer chirurgicalement un organe comme le thymus, mais les cellules que nous souhaitons étudier sont souvent disséminées dans l'organisme, ce qui empêche une ablation chirurgicale. Il est alors important de pouvoir induire la déplétion du type de cellules à étudier. Dans ce projet nous allons caractériser les conséquences de la délétion des cellules, et générer des lots de souris avec des déplétions cellulaires ciblées pour les étudier dans des modèles de maladies selon d'autres projets en cours au laboratoire.

Le principe de l'ablation cellulaire ciblée repose sur le fait que la souris est naturellement résistante à la toxine diphtérique (DT) car elle n'exprime pas son récepteur (DTR); en introduisant le récepteur DTR sur les cellules à cibler, puis en traitant les souris à la DT, on provoque l'élimination ciblée de ces cellules.

Plusieurs axes sont envisagés

- Etudier le rôle des cellules épithéliales pulmonaires (gène acid) dans la formation de la fibrose pulmonaire. Le mécanisme n'est pas bien identifié et implique plusieurs types cellulaires. L'étude d'un type cellulaire particulier permettra de mettre en évidence son rôle dans cette pathologie.

- Etudier le rôle des plaquettes dans la réponse inflammatoire : La déplétion des plaquettes sanguines entraîne des dysfonctionnements globaux. Au contraire, induire la déplétion partielle et réversible des plaquettes (gène pf4) permettra d'étudier leur rôle dans l'immunité.

- L'ablation des cellules épithéliales de l'intestin (gène villin) permettra d'étudier le rôle de la barrière intestinale et les mécanismes inflammatoires induits lors de la rupture de cette barrière, en association avec le microbiote intestinal.

- Les cellules myéloïdes (gène lysM) sont responsables de la mise en place de la réponse innée et inflammatoire. L'ablation ciblée de ces cellules permettra d'apprécier leur rôle dans les mécanismes étudiés.

Pour supprimer les populations cellulaires, l'approche génétique chez la souris permet l'expression du récepteur DTR sur les cellules ciblées pour les tuer les souris exprimant le gène iDTR avec une cassette STOP floxée, sont croisées avec des souris exprimant le gène Cre recombinaise permettant d'exprimer le récepteur ciblé sur les cellules (Cre tissus spécifique) puis l'induction est faite par le traitement à la toxine DT qui déclenchera la mort cellulaire des cellules exprimant son récepteur.

C'est donc l'expérimentateur qui, par l'administration du traitement DT induira de façon contrôlée l'ablation cellulaire dans les 24h en déclenchant dans les cellules cibles un arrêt de la synthèse protéique.

Production d'animaux iDTRxCre :

Des souris exprimant le gène floxé iDTR seront croisées avec des souris exprimant la Cre tissus spécifique de types cellulaires comme le gène villin ciblant l'épithélium intestinal, Acid ciblant l'épithélium pulmonaire, lysM ciblant les cellules myéloïdes, ou pf4 ciblant les plaquettes. Ces souris n'ont pas de phénotype dommageable.

Induction des déplétions cellulaires par la DT :

Selon les protocoles décrits, les doses de DT sont de l'ordre de 10-100ng/souris en 3-5 administrations échelonnées pour une déplétion cellulaire rapide, ou 1-3 fois par semaine sur plusieurs semaines pour une administration chronique. Dans la littérature, des doses de 100µg de DT purifiée/souris injectées en intrapéritonéal n'ont aucun effet sur les souris C57BL6, au niveau hématologique et mortalité. Il en va de même pour les souris exprimant seulement iDTR floxé seul ou Cre seul.

L'ablation cellulaire peut déclencher des effets indésirables sur les animaux, caractérisés par une perte de poids, ou des effets plus spécifiques comme une immunodéficience ou inflammation, selon le type de cellules déplétées. Un tableau de score clinique ainsi que la prise de poids des animaux sera réalisé quotidiennement pour identifier rapidement les effets secondaires. Différents types d'administrations seront réalisés pour minimiser au maximum la quantité de toxine injectée et cibler au mieux les populations cellulaires visées, ou obtenir une déplétion localisée.

Une surveillance quotidienne des animaux y compris les week-ends est effectuée pendant la période d'acclimatation et d'expérimentation.

Le projet représente un ensemble d'études types. Le projet comportera jusqu'à 48 études avec traitement à la DT : soit typiquement pour chaque croisement étudié 2 études de mise au point de l'ablation cellulaire, 3 études de caractérisation, et 3 études dans un modèle de pathologie. Une étude comportera jusqu'à 15 animaux. 720 souris seront nécessaires au maximum sur 5 ans pour la procédure expérimentale.

A ce jour, l'animal de laboratoire reste le seul recours fiable et pertinent permettant de tester la réponse immunitaire de l'hôte. Ce projet sera réalisé en respectant les principes fondamentaux de l'expérimentation animale

Remplacement le modèle animal est fondamental dans notre cas, puisque l'étude de l'inflammation et de l'impact de déplétion d'une population cellulaire dans l'ensemble d'un organisme et de la pathologie ne peut se faire que sur un organisme vivant entier.

Raffinement les animaux sont observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être et d'éviter au maximum la douleur au moment de l'expérimentation. Ils sont hébergés par 4-5 souris par cage de type II. Dans un souci de bien-être des animaux, une anesthésie légère sera utilisée pour réaliser les instillations ou intratrachéales. De plus, une surveillance des animaux est réalisée quotidiennement et consiste en l'observation de l'aspect général de l'animal, de son comportement et de sa mobilité. Une prise de poids est réalisée 1 fois par jour pendant l'expérience. Si des animaux présentent des signes de souffrance atteignant le point limite : perte de poids >20% et/ou score de

3, ils seront mis à mort. Les analgésiques ne sont pas administrés car ils peuvent interférer avec le système immunitaire et influencer les résultats expérimentaux.

Réduction Suivant les résultats, les expériences pourront être répétées pour valider les résultats et le nombre d'animaux utilisé est réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement pertinents et reproductibles.

15174 La lamproie marine (*Petromyzon marinus*) est une des trois espèces de lamproies européennes, toutes protégées au titre de la directive habitat faune flore 92/43/CEE. Les frayères de lamproies correspondent à des zones présentant un courant supérieur à 50 cm/s, une profondeur d'environ 50 cm, et un substrat composé de galets et de graviers. Les lamproies y déplacent les galets pour construire des nids constituant des cuvettes d'un à deux mètres de diamètre et quelques dizaines de centimètres de profondeur. Les galets déplacés sont entassés à l'aval de la cuvette. Chaque femelle pond en moyenne 200 000 œufs. La ponte a lieu dans la cuvette où ne subsiste que du substrat fin, dont les œufs agrègent quelques particules puis s'infiltrant entre les galets à l'aval, où ils sédimentent puis se développent pendant environ deux semaines. La taille et la forme des nids, ainsi que le micro-habitat où ils sont construits peut beaucoup varier.

Intuitivement, on considère que la fonction des nids est de protéger les œufs pendant leur développement. Cependant, on ne connaît pas du tout la relation entre les caractéristiques des nids et leur efficacité en termes de survie des œufs. Décrire cette relation est le premier objectif de cette étude. Pour cela, nous prospecterons quotidiennement pendant la saison de reproduction (mai-juin) une frayère naturelle de lamproie à la recherche de 50 nids récemment creusés. Nous en mesurerons plusieurs caractéristiques (diamètre, profondeur, granulométrie, vitesse de courant) que nous mettrons en relation avec deux composantes de la survie des œufs la rétention dans le nid au moment de la ponte, et la survie durant l'incubation dans le nid. Pour cela on collectera des œufs de 4 femelles et du sperme de 2 mâles pour réaliser des fécondations, injecter un nombre connu d'œufs dans des nids pour estimer leur rétention, et en placer dans des boîtes d'incubation pour tester l'effet du nid sur l'aboutissement de leur développement embryonnaire. Remplacement il n'est pas possible de remplacer les animaux car la question porte sur la survie de leurs embryons en milieu naturel et les données concernant cette survie n'existent pas. Réduction une lamproie femelle produisant en moyenne 200 000 œufs, une femelle et un mâle suffiraient pour fournir tous les gamètes nécessaires à cette expérience mais nous préférons travailler avec quatre femelles et deux mâles, soit un total de six individus, pour limiter le risque d'échec de développement lié à des facteurs individuels (génétiques par exemple), et pour pouvoir distribuer l'expérience sur plusieurs jours en disposant à chaque fois de gamètes frais. Raffinement les lamproies seront capturées à l'épuisette sur les nids et aussitôt anesthésiées. A maturité, les gamètes sont libérés dans la cavité générale des lamproies et sortent facilement et sans douleur par le cloaque lorsqu'une légère pression des doigts est appliquée sur l'abdomen. La collecte de gamètes nécessitera quelques secondes, après quoi les adultes seront replacés sur leur nid pour y poursuivre leur reproduction naturelle puisque nous n'aurons pas prélevé la totalité de leurs gamètes.

Par ailleurs, la lamproie est une espèce sémelipare, c'est-à-dire que chaque individu ne participe qu'à une seule saison de reproduction puis meurt, ce qui laisse peu de possibilité de "rattraper" une reproduction manquée. Néanmoins, des observations préliminaires suggèrent que chaque individu peut construire plusieurs nids au cours de son unique saison de reproduction. Une deuxième partie du projet consiste alors à étudier la mobilité des géniteurs, en termes de surface et de nombre de nids fréquentés. L'objectif est de tester l'effet du sexe et de la longueur corporelle (liée à la quantité de réserves énergétiques) sur le nombre et les caractéristiques des nids construits. Pour cela, 40 lamproies marines (20 mâles et 20 femelles) seront acquises auprès de pêcheurs professionnels exerçant à l'aval du bassin versant, transportées jusqu'à la frayère, anesthésiées, marquées avec des émetteurs radio internes, et suivies tout au long de la saison de reproduction. Un suivi manuel et un réseau d'antennes fixes permettront de localiser les individus en continu et d'identifier les nids construits par chacun. Cette expérience sera menée sur deux années, en suivant à chaque fois 10 mâles et 10 femelles, soit un total de 40 individus. Ceci permettra 1) d'appliquer un effort d'observation suffisant pour obtenir des données précises sur chaque individu, et 2) de ne

poursuivre le suivi en deuxième année que si les observations de la première année montrent l'innocuité du marquage et que la taille d'échantillon est insuffisante.

Remplacement il n'est pas possible de remplacer les animaux car la question porte sur leurs déplacements en milieu naturel pendant la reproduction. Les lamproies utilisées pour cette expérience seront acquises auprès de pêcheurs professionnels, donc normalement destinées à l'abattage et à l'alimentation humaine. Réduction les déplacements diffèrent certainement entre les mâles et les femelles donc il est nécessaire de travailler avec un nombre suffisant d'individus de chaque sexe pour décrire correctement leur comportement. Le phasage en deux ans permettra éventuellement d'arrêter l'expérience à l'issue de la première année en cas d'effet délétère du marquage. Raffinement le marquage sera fait sous anesthésie, ne prendra que quelques minutes par individu, et suivra une procédure appliquée plusieurs fois dans le suivi de la migration des lamproies pendant plusieurs semaines. Cette procédure consiste à inciser l'abdomen sur 1.5cm avec un scalpel stérile, y introduire un émetteur cylindrique de 4cm³, et suturer avec trois points de fil chirurgical. Une fois les individus marqués réveillés et relâchés, l'étude implique de les observer visuellement le plus souvent possible, ce qui maximisera la collecte de données comportementales et facilitera l'application de points limites.

Au total, les deux parties du projet impliqueront 46 individus.

15175 La paraplégie spastique héréditaire (HSP) de type SPG11 est une forme précoce et très sévère d'affection neurologique se traduisant par une atteinte de la motricité des membres inférieurs et une atteinte mentale variablement associés à une atteinte cérébelleuse et du système nerveux périphérique. Des mutations de type perte de fonction ont été trouvées chez les patients dans le gène SPG11/KIAA1840 et rendent compte de 20% des cas de paraplégies spastiques transmises selon un mode autosomique récessif. A ce jour, aucun traitement effectif n'a encore été développé pour cette maladie.

Nous souhaitons confirmer la preuve de concept, permettant de ralentir ou inverser le processus pathologique de cette maladie, de notre collaborateur via l'utilisation et l'étude des effets et de l'efficacité d'un nouveau composé dans un modèle de souris mimant la HSP de type SPG11. Le but étant de transposer cette preuve de concept thérapeutique en clinique pour le traitement de patients atteints de la paraplégie spastique héréditaire de type SPG11.

REPLACEMENT Les modifications génétiques chez les souris nous permettent d'étudier les pathologies humaines, de mieux comprendre leur développement, de tester des thérapies et leur potentielle toxicité. Ces effets ne peuvent être observés que sur un organisme vivant, c'est pourquoi nous utiliserons des souris. Aucune autre alternative n'existe pour vérifier que l'injection d'un composé dans un organe complexe tel que le cerveau est spécifique à notre cible thérapeutique et ne génère pas de toxicité sur les autres types cellulaires présents dans le cerveau.

REDUCTION Une sélection des composés sera réalisée *in silico* et *in vitro* (*in silico* pour limiter le nombre de composés sélectionnés et *in vitro* pour les tests de toxicité cellulaire généraux) afin de réduire au mieux le nombre de tests *in vivo* réalisés et donc le nombre total de souris utilisées. Un nombre de 5 à 7 souris par groupe sera utilisé selon les procédures afin de garantir la validité scientifique de l'étude. Un nombre maximum de 481 souris sera utilisé pour l'ensemble du projet.

RAFFINEMENT Afin d'améliorer le bien-être animal tout au long de sa vie, les conditions d'élevage et d'hébergement seront optimisées par un enrichissement dans toutes les cages (coton et frisure pour faire un nid, bâtons à ronger), le regroupement des animaux de même sexe et/ou de même portée pour limiter l'isolement et favoriser le comportement social. De la nourriture adaptée à ce modèle de souris sera utilisée. Au cours de l'étude, tout signe d'inconfort sera pris en charge en prenant les mesures appropriées en fonction du niveau observé, limitant ainsi la souffrance à l'animal. Les procédures invasives seront réalisées sous anesthésie et analgésie. La température corporelle sera maintenue grâce à un tapis chauffant thermostaté jusqu'au complet réveil de l'animal. Les animaux seront ensuite suivis et la souffrance sera évaluée. Des points limites prédictifs seront établis permettant d'interrompre l'étude limitant ainsi la souffrance, la douleur et le stress pour l'animal.

15176 CONTEXTE

Les métastases hépatiques de cancers colorectaux représentent un problème majeur de santé publique. Le seul traitement à visée curative est la chirurgie de résection mais la majorité des patients (entre 70 et 80%) ne sont pas éligibles. Parmi les contre-indications à la chirurgie, l'atteinte de la zone nommée confluent cavo-sus-hépatique reste actuellement sans aucune solution valide. Des études ont montré que le contact entre une métastase et un vaisseau de gros calibre engendre un taux d'échec plus élevé avec les techniques de destruction tumorale actuellement disponibles (comme la radiofréquence et la cryothérapie) en raison d'une dispersion calorifique du traitement par le flux sanguin.

Les ultrasons focalisés de haute intensité (HIFU) représentent une technique de destruction tumorale efficace et peu dépendante de la perfusion sanguine. La destruction tissulaire par HIFU apparaît donc très indiquée pour traiter la zone de confluent.

La sonde HIFU qui sera mise en œuvre est actuellement utilisée en clinique pour traiter des métastases dans d'autres zones du foie. La technique n'est pas dépendante du flux sanguin pour les vaisseaux inférieurs à 5 mm de diamètre mais il n'existe pas de données sur les structures vasculaires majeures du foie. IL a été montré précédemment l'innocuité d'un tel traitement à court terme en ciblant une zone qui évite les lésions secondaires non désirées. Il a également été montré qu'il était possible de répéter les lésions sur la même zone cible d'un animal à un autre.

OBJECTIFS

1- S'assurer que les lésions HIFU englobent bien le vaisseau à l'aide de l'IRM.

2- Vérifier la persistance du flux dans le vaisseau visé à l'aide du DOPPLER.

Ces étapes sont nécessaires pour le passage en clinique de la technique.

TYPE DE PROJET/PROCEDURES/ESPECE ANIMALE/SORT DE L'ANIMAL

Ce projet de recherche translationnelle d'une durée maximale de 2 ans mettra en œuvre un maximum de 3 porcs. La procédure consistera à opérer l'animal sous anesthésie générale, d'appliquer le traitement par HIFU dans la région cavo-sus-hépatique puis à suivre l'animal pendant 18 jours. Un contrôle DOPPLER (à 7 jours) puis par IRM (à 16 jours) sous anesthésie seront effectués. Enfin l'animal sera mis à mort et autopsié pour rechercher des complications et prélever le foie et les organes environnants pour analyse histologique.

Conformité avec les 3R

Réduction 3 animaux est le strict minimum nécessaire pour évaluer la sécurité et la répétabilité du traitement avant le passage en clinique.

Raffinement Le protocole d'anesthésie a été mis au point afin d'éviter toute souffrance. La sonde sera manipulée par des chirurgiens expérimentés.

Remplacement Des travaux préalables ont été réalisés ex-vivo et en modélisation afin de valider la technique mais il est à présent nécessaire de pouvoir valider la procédure chirurgicale de traitement sur animaux vivants avant de pouvoir passer en clinique.

15177 Rationnel Le biofilm est une communauté bactérienne adhérant à des surfaces inertes, engluée dans une matrice la protégeant du système immunitaire et de l'action des antibiotiques. Ce mécanisme de persistance bactérien est notamment impliqué dans les infections à staphylocoque doré (*Staphylococcus aureus*) sur matériel comme les prothèses articulaires, les rendant très difficiles à traiter. De nombreuses techniques ont été développées pour évaluer l'action anti-biofilm des antibiotiques *in vitro*, avec des résultats souvent peu reproductibles. En effet, le biofilm est une structure complexe, dont la quantité, l'architecture et la composition varie selon l'environnement, et donc les conditions de culture utilisées. Des modèles animaux ont donc été développés, basés sur l'implantation de matériaux secondairement infectés, avant traitement des animaux par la molécule testée. Leur principale limite réside dans le nombre limité de molécules et de concentrations évaluables, chaque animal ne pouvant servir au test d'une seule condition.

Objectifs Etablir et valider un modèle de formation de biofilm *in vivo* chez le lapin, permettant secondairement l'évaluation *ex vivo* de l'activité anti-biofilm de plusieurs molécules et à différentes concentrations à partir d'un seul animal, et donc de réduire le recours à ces derniers.

Méthode expérimentale i) Implantation sous-cutanée de 8 implant tubulaire sous-cutané micro-perforé par animal contenant chacune 6 billes (soit 48 conditions évaluables par animal); ii) Infection des cages immédiatement ou 14 jours après; iii) Récupération des billes 1 à 4 semaines après pour évaluer le biofilm formé et l'activité anti-biofilm de divers antibiotiques.

Plan expérimental nombre maximum d'animaux nécessaire au projet = 18

1) Mise au point du modèle : détermination de l'inoculum et des délais implantation / infection (post-opératoire immédiat et J14) et infection / évaluation (J7, J14, J28) – 12 à 15 animaux

2) Validation thérapeutique du modèle détermination de la concentration minimale éradicatrice de biofilm de deux anti-staphylococciques réputés actifs dans le biofilm (rifampicine, daptomycine) – 3 animaux

Avantages développement d'un modèle performant et reproductible, respectueux des 3R, permettant de fournir une méthode d'évaluation du biofilm réduisant de façon très significative le nombre d'animaux utilisés par rapport aux techniques existantes

Démarche éthique

- Réduction mise au point des techniques *in vitro* au préalable, mise au point du modèle par étapes de screening, objectif lui-même visant à développer un modèle qui permettra de réduire le nombre d'animaux nécessaire à l'étude du biofilm par rapports aux méthodes existantes.

- Raffinement méthodes d'anesthésie et d'analgésie adaptées aux procédures, hébergement et acclimatation conforme aux recommandations, points limites adaptés aux procédures

- Remplacement les techniques d'évaluation de biofilm *in vitro* présentent une importante variabilité liée aux conditions de culture, rendant le recours aux modèles animaux indispensable pour étudier la formation de biofilm en conditions physiologiques. Toutefois, le modèle développé vise en lui-même à réduire le nombre d'animaux utilisés pour l'étude du biofilm en multipliant le nombre de conditions testables par animal (n=48) grâce au système des Implant tubulaire sous-cutané micro-perforé/billes implantées et en externalisant *in vitro* les étapes d'évaluation finales.

15178 L'anguille est sur la liste rouge des espèces menacées par l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature (UICN France). Elle a aussi été classée en annexe II de la CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of wild fauna and flora), ce qui limite sa commercialisation hors Europe. Un plan de gestion de l'espèce a été élaboré à l'échelle Européenne en 2007. Chaque état membre a son propre plan de gestion national, et en France il inclut, par exemple, une obligation à relâcher pour le repeuplement 60% des civelles (alevins d'anguille) pêchées. Les anguilles ont un cycle de vie catadrome, c'est-à-dire qu'elles se reproduisent en mer et grandissent en eau douce (ou plus ou moins salée). Les adultes se reproduisent dans la mer des Sargasses et les larves issues de cette reproduction entreprennent alors une migration grâce au Gulf Stream et à la dérive Nord-Atlantique et se distribuent sur les côtes européennes (et jusqu'aux extrêmes Nord et Sud, Islande et Maroc). Elles se métamorphosent en civelles à l'arrivée vers le plateau continental et sous nos latitudes arrivent au niveau des estuaires essentiellement entre Octobre et Mars. Elles réalisent pour la plupart, une migration portée (en utilisant la marée montante) et continuent leur métamorphose au cours de cette remontée estuarienne. L'histoire de vie de ces jeunes anguilles sera très variable en fonction de l'endroit où elles vont grandir, de leur date d'arrivée, ou encore de leur densité. La densité serait l'une des conditions environnementales parmi les plus influentes qui agirait sur l'orientation vers le sexe mâle ou femelle. Cependant, la densité agit sur de nombreux facteurs proximaux, parmi lesquels les relations inter-individuelles qui pourraient engendrer un stress chez les anguillettes en début de croissance. Or, le stress a récemment été mis en avant comme un facteur possible agissant sur l'orientation vers le sexe mâle, du fait de l'action inhibitrice du cortisol sur l'aromatase, l'hormone qui transforme la progestérone en œstrogène. Comme par ailleurs, on observe *in natura* une distribution contrastée à l'échelle du bassin versant avec plutôt des femelles dans le haut des bassins versant où la densité est faible et

plutôt des mâles à l'aval (où la densité est plus forte), et qu'en aquaculture ce sont 90 à 95% de mâles qui sont produits, le stress apparaît comme un candidat sérieux au déterminisme du sexe chez l'anguille. Nous proposons de lancer des travaux permettant d'étudier le lien entre différents comportements de l'anguille (comportement de migration estuarienne, prise alimentaire, niveau d'activité, comportements agonistiques) et différents paramètres physiologiques (métabolisme standard, croissance, niveaux de cortisol, niveaux d'expression des gènes dans les gonades), avec le stress. Pour cela il est nécessaire de réaliser une première série d'expérimentation pour mettre au point certains protocoles qui ne sont pas encore calés. La première procédure concerne l'évaluation de la sensibilité au stress, qui sera faite sur le stade civelle par un suivi en continu du métabolisme standard et l'application d'un stress lumineux sur 16 individus afin de fixer les caractéristiques d'un stress efficace, ainsi que sa durée. La seconde procédure consistera à évaluer dans des boîtes de tests comportementaux le caractère timide ou téméraire d'un individu civelle (temps de sortie d'un abri, durée et trajet d'exploration...). Enfin, la troisième procédure consistera à tester la faisabilité d'une mesure de cortisol dans un bac de confinement. Il n'est pas possible de remplacer l'anguille par une autre espèce à cause de ses spécificités biologiques et des enjeux sur sa conservation, ni par des animaux d'élevage car le cycle de l'anguille n'est pas maîtrisé (Remplacement). Les observations comportementales se feront par observation direct ou par vidéo et les mesures de cortisol par prélèvement d'eau afin d'intervenir le moins possible sur les animaux. Toutes les conditions d'hébergement seront pensées pour diminuer le stress (Raffinement). Celles dédiées à l'évaluation de la sensibilité au stress nécessiteront bien-sûr d'en créer un (mais il sera contrôlé et des points limites définis sur la base de la consommation en oxygène et de l'observation qui sont deux indicateurs reconnus pour l'évaluation du stress en temps réel). Les trois procédures seront réalisées sur les mêmes individus (Réduction). Nous prévoyons deux lots de 8 individus, afin de pouvoir ajuster les tests sur le premier lot, et valider la procédure sur le second. En tout, ce seront donc 16 individus qui seront marqués individuellement et qui resteront moins de 15 jours dans nos installations (la civelle en milieu naturel passe par une phase de jeûne au début de sa métamorphose et n'a donc pas besoin d'être nourrie à ce stade de développement). Les individus seront ensuite euthanasiés afin de confronter les résultats à des paramètres biologiques (expression de gènes liés au stress).

15179 Ce projet a pour objectif d'évaluer chez le macaque l'immunogénicité et l'innocuité de candidats vaccins développés en traitements préventifs et/ou thérapeutiques de maladies infectieuses.

Ces candidats incluent des protéines recombinantes en présence ou non d'adjuvant, des virus ou bactéries atténués vivants ou inactivés en présence ou non d'adjuvant, des acides nucléiques (ARN ou ADN), des vaccins sous-unitaires de type polysaccharides, anatoxines, etc....

L'évaluation de l'immunogénicité sur animaux est l'une des méthodes décrites pour démontrer l'efficacité préclinique des candidats vaccins avant d'envisager des études cliniques chez l'homme.

Les essais d'immunogénicité permettent d'évaluer le bénéfice de différentes préparations vaccinales, d'identifier les composants nécessaires à la formulation vaccinale, d'évaluer les nouvelles voies d'administration ou les nouvelles formes pharmaceutiques qui permettent d'améliorer la performance du vaccin. Ces études permettent également de comprendre le mécanisme d'action des candidats vaccins.

Un test d'immunogénicité consiste à administrer à des animaux un candidat vaccin, à les héberger pendant la période nécessaire à l'obtention d'une réponse immunitaire, puis à recueillir du sang, des fluides corporels et/ou des organes afin d'analyser par des méthodes *in vitro* la réponse immune humorale et/ou cellulaire. Ces différentes données précliniques sont un préalable aux essais cliniques et à l'enregistrement du candidat vaccin et seront incluses dans les différents dossiers réglementaires.

Les espèces utilisées pour ce projet sont le macaque cynomolgus et le macaque rhesus. Le modèle animal utilisé est sélectionné en fonction de la maladie infectieuse ciblée, du type de réponse immune analysée et des données de la littérature ou des connaissances scientifiques. Il est estimé qu'au cours de ce projet d'une durée de 5 ans, 400 macaques seront nécessaires.

Mise en œuvre des 3R

Remplacement : Des essais *in vitro* sur cellules animales ou humaines sont également utilisés pour évaluer l'immunogénicité. Ils apportent des données complémentaires mais, à ce jour ne peuvent se substituer aux essais *in vivo*.

Réduction : Les schémas expérimentaux de ce projet feront l'objet d'une revue par des biostatisticiens, afin de calculer au plus juste le nombre d'animaux nécessaire.

Raffinement : Les animaux sont hébergés en groupe dans des cages ou volières contenant des dispositifs d'enrichissement dans des locaux appropriés, conformes aux standards réglementaires et suivis par un personnel spécifiquement formé.

L'anesthésie chimique est recommandée et est appliquée dès que le type de manipulation le permet.

15180 Ce projet a pour objectif d'assurer la fourniture des produits biologiques, d'origine animale, nécessaires à la réalisation des projets de Recherche et Développement (R&D). Les tests de R&D sont des tests permettant le développement de nouveaux vaccins de haute qualité et répondant à des besoins médicaux non satisfaits.

Les produits biologiques (Anticorps polyclonaux, sang, sécrétions ou tissus d'animaux) sont nécessaires pour la mise en œuvre de tests *in vitro*. A ce jour, ils ne peuvent pas toujours être produits sans le recours de l'animal de laboratoire.

Ce projet pourra conduire à l'utilisation d'au maximum 1000 souris, 200 rats, 200 hamsters, 200 cobayes, 200 lapins, 30 furets et 30 porcs sur une période de 5 ans.

Les protocoles qui génèrent la collecte de sang, de sécrétions, d'organes ou l'immunisation d'animaux avec des mélanges d'antigènes et d'adjuvants n'entraînant pas de réactions locales ou générales ne présentent pas de risque pour les animaux. Dans le cas où les animaux présenteraient des lésions cutanées des soins appropriés seront réalisés. Bien qu'en général non attendu, 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.

Le degré de sévérité est considéré comme léger et pouvant aller jusqu'à modéré pour la production de certains anticorps polyclonaux avec des adjuvants induisant une réaction inflammatoire connue.

L'ensemble des animaux est euthanasié selon des méthodes recommandées par la réglementation et approuvées par le Comité d'éthique et la Structure de Bien-être Animal dont relève l'établissement utilisateur.

Mise en œuvre des 3R Remplacement :

Les produits d'origines animales sont utilisés uniquement lorsque des produits fabriqués *in vitro* (anticorps monoclonaux par exemple) ne sont pas disponibles ou adaptés à l'utilisation visée.

Réduction

Le nombre d'animaux utilisés est calculé au plus juste de façon à répondre aux besoins de tests sur la période (quantité de réactifs). Ce calcul tient compte des durées de péremption des produits mais aussi des évolutions technologiques pour les tests considérés.

Raffinement

Les animaux sont hébergés en groupe dans des cages contenant de l'enrichissement (abris, surfaces de repos) dans des locaux appropriés et conformes aux standards réglementaires. En 2019, le Comité d'Éthique de l'entreprise a revu une Position Institutionnelle encadrant l'utilisation de l'adjuvant de Freund pour la génération d'anticorps polyclonaux et définissant la politique de l'entreprise sur ce sujet. Ainsi, l'Adjuvant Complet de Freund (ACF) est proscrit de tous nos tests, et peut être utilisé sous condition sous sa forme incomplète en étant dûment justifié et limité à un protocole le moins sévère possible. De plus, l'utilisation d'autres adjuvants moins réactogènes est encouragée.

15181 Le but de ce projet est la mise en place d'un élevage de souris achondroplases dans le but de pouvoir réaliser des expérimentations sur ces souris permettant de développer notamment de nouvelles thérapies car il n'existe actuellement pas de traitement pour l'achondroplasie.

Nous utiliserons dans ce projet des souris qui présentent la même pathologie que celle exprimée chez l'homme. Il s'agit d'une souche à phénotype dommageable (troubles de la locomotion, paralysie unilatérale, paralysie bilatérale avec atteinte de la vessie, troubles respiratoires). Ce projet nécessite l'utilisation de ces animaux afin de générer des animaux qui pourront ensuite être utilisés dans d'autres projets d'expérimentation.

Ce projet aura des bénéfices pour l'Homme. À l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement pour l'achondroplasie. Maintenir un élevage de ces souris permet donc de pouvoir faire ensuite des tests de traitement sur les animaux.

Afin de satisfaire aux exigences de la règle des 3R, nous avons mis en place différentes stratégies pour ce projet

- Dans un objectif de Raffinement aucun animal homozygote ne sera généré. En effet, les homozygotes sont létaux *in utero* comme dans le phénotype humain. Le phénotype hétérozygote est suffisamment proche de la pathologie humaine et permet de réaliser des expérimentations pertinentes scientifiquement. Des points limites précoces ont été établis afin de réduire au maximum la potentielle souffrance des animaux.

- Dans un objectif de Réduction, l'expérimentation se déroule avec un maintien d'une petite cohorte d'animaux en permanence et l'augmentation du nombre d'animaux seulement en cas de besoin de générer des géniteurs pour des procédures expérimentales.

- Dans le cadre de ce projet le Remplacement n'est pas possible à ce jour. Cependant les études *in vivo* sont toujours précédées d'études *in vitro* permettant de réduire le nombre d'animaux utilisés. Enfin, 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.

Nous estimons que nous allons utiliser au maximum 15940 souris.

15182 L'aquaculture a connu un essor considérable au cours des dernières décennies (en moyenne +6% en tonnes de production mondiale par an) mais l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) compte sur l'aquaculture pour poursuivre sa croissance afin de fournir suffisamment de protéines animales à plus de 9 milliards de personnes à l'horizon 2050. Cependant, le développement durable de l'aquaculture est confronté à deux problématiques actuelles qui sont le réchauffement climatique et la disponibilité de plus en plus limitée de la farine et de l'huile de poisson qui sont les ingrédients traditionnels des aliments pour poissons. Des efforts ont été déployés pour remplacer la farine et l'huile de poisson par des matières premières végétales mais leur introduction à de trop forts taux dans l'alimentation des poissons, réduit considérablement la croissance des poissons. La truite arc-en-ciel, du fait qu'elle soit carnivore, est métaboliquement adaptée à une forte utilisation des protéines mais au contraire à une faible utilisation de glucides alimentaires. Or les produits issus des végétaux terrestres contiennent des taux élevés de sucres. Le changement climatique, quant à lui, entraîne une augmentation de température et ainsi une baisse en teneur en oxygène des milieux aquatiques. Cette baisse du taux d'oxygène dans l'eau (hypoxie) est connue pour être un élément stressant pour les animaux et pouvant impacter le métabolisme des animaux aquatiques, en particulier le métabolisme des glucides.

Dans ce contexte actuel, il est nécessaire d'étudier la capacité de l'animal à s'adapter à un environnement et une alimentation qui changent. Ces 2 paramètres étant liés, il est nécessaire d'étudier leur interaction.

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'impact d'une hypoxie et d'un aliment riche en glucides sur la prise alimentaire et le métabolisme glucidique de la truite.

Pour répondre à cela, un essai d'alimentation de 4 semaines comprenant 4 traitements sera conduit en triplicat (3 bassins par traitement) sur des truites arc-en-ciel de 250g.

Les truites seront placées dans des bassins à concentration en oxygène soit faible (hypoxie) soit normal (respectivement 60% d'O₂ et 100% d'O₂) et nourries avec un aliment soit riche en sucres (30%) soit un aliment témoin sans sucres.

Ce nombre se répartit comme suit

- 120 truites dans des bassins à 100% d'oxygène dont 60 ont un régime avec glucides et 60 autres ont un régime sans glucides,

- 120 truites dans des bassins à 60% d'oxygène dont 60 ont un régime avec glucides et 60 autres ont un régime sans glucides.

La durée de 4 semaines est incompressible pour ne pas nuire à la qualité des résultats. Les animaliers réaliseront des contrôles deux fois par jour pour retirer les poissons en très grande souffrance et ceux qui sont retrouvés morts.

En condition dite d'hypoxie, le taux d'oxygénation sera maintenu dans des normes acceptables et similaires à celles pouvant exister en élevage de production à forte densité. Les deux aliments sont formulés sur la base de la composition des aliments actuellement commercialisés chez la truite, de façon à couvrir l'ensemble des besoins nutritionnels de l'animal. Les poissons seront alimentés manuellement deux fois par jour jusqu'à satiété visuelle. Au total, 240 animaux seront mis en élevage.

Les animaux ne subiront aucune pesée (ou autre mesure) au cours de l'expérimentation, seuls des prélèvements finaux seront réalisés sur 36 animaux. L'expérimentation comprendra donc un échantillonnage en fin d'expérimentation 6h après le dernier repas pour suivre les flux après repas des glucides et l'activation des mécanismes moléculaires. Les animaux échantillonnés seront préalablement anesthésiés puis euthanasiés avant les prélèvements par une surdose d'anesthésiant. Sur 9 poissons par traitement, soit un total de 36 animaux pour les 4 traitements, le sang, le foie, le muscle et le cerveau seront échantillonnés. Au total, 36 animaux seront sacrifiés lors de cette expérimentation. Les animaux restants seront simplement anesthésiés et pesés puis repartiront dans un circuit classique d'élevage. L'étude porte sur l'impact d'une hypoxie, d'un régime alimentaire riche en sucres et l'interaction de ces paramètres sur la prise alimentaire des poissons et le métabolisme des animaux, elle ne peut donc pas être appréhendée sur lignée cellulaire ou par modélisation.

15183 Ces dernières années ont fortement contribué à mettre en évidence le rôle clé du microenvironnement tumoral (toutes les cellules non tumorales qui entourent et interagissent avec la tumeur) dans le développement de la tumeur, son expansion métastatique et la réponse aux traitements. Une stratégie antitumorale en développement est l'utilisation de médicaments anticancéreux qui agissent en inhibant les voies de réparation de l'ADN. Ces drogues agissent en synergie avec la radiothérapie et la plupart des chimiothérapies. Elles ont été testées en association avec la radiothérapie dans un essai clinique de phase I/II sur des malades présentant une métastase locale de mélanome cutané.

L'étude proposée vise à analyser les modifications du microenvironnement durant les traitements, préparer des essais cliniques en association à la chimiothérapie et la radiothérapie en définissant les meilleures combinaisons et les protocoles d'administration. Les modèles tumoraux testés seront les tumeurs du poumon et les tumeurs du cerveau.

Des cellules cancéreuses humaines sont greffées selon la localisation primaire de la tumeur ou de la métastase sur des souris adultes sous anesthésie. Les traitements associés, tels que les chimiothérapies ou la radiothérapie, sont administrés suivant le protocole le plus en usage.

Pour l'ensemble des expériences prévues, le nombre de souris utilisées est estimé à 4650 souris sur une durée de 5 ans.

Nous effectuerons des mesures régulières sur de nombreux paramètres mesure du volume de la tumeur par des méthodes non invasives tel que l'imagerie par IRM ou par l'analyse des marqueurs circulants dans certains modèles, formule sanguine, pesée de l'animal, comportement de l'animal. Ces mesures permettront l'évaluation de l'efficacité du traitement sur la tumeur ainsi que

d'éventuels effets indésirables des traitements. Ainsi ce suivi régulier sur un même animal de la progression tumorale par différents paramètres nous permettra d'une part d'augmenter la quantité et la qualité des données récoltées et d'avoir recours à des analyses statistiques plus puissantes réduisant le nombre d'animaux utilisé (Réduire).

Comme le micro environnement tumoral est un système complexe aux paramètres extrêmement nombreux et dont la plupart sont inconnus il nous est impossible de recréer cet environnement *ex vivo*. C'est pour cela que nous devons avoir recours à des études sur l'animal dans lequel tous les paramètres sont présents. Cependant avant l'expérimentation sur animal, les drogues sont testées sur des cultures de cellules de même type tumoral afin d'évaluer au préalable leur potentielle efficacité sur ce type de cancer et ainsi diminuer le nombre d'animaux utilisés. (Remplacement)

En accord avec les recommandations internationales, en particulier dans le domaine de la cancérologie, les animaux sont suivis individuellement afin d'assurer leur bien-être et les expérimentations sont stoppées avant la souffrance de l'animal.

15184 L'objectif de ce projet de recherche est de permettre l'identification de composés chimiques ou biologiques pour le développement de nouveaux médicaments. Dans le cadre de cet objectif, l'étude de la tolérance de ces composés dans l'organisme de rongeurs (rat et souris) après leur administration, est une étape indispensable et ceci quelle que soit l'indication thérapeutique. Les techniques utilisées dans les procédures expérimentales de ce projet permettent de contrôler la tolérance des composés après leur première administration unique ou répétées (voie intraveineuse, orale, topique, etc...) dans les conditions définies. Les données ainsi générées participent à la détermination de la dose maximale tolérée dans l'organisme, afin de mettre en place les études d'activités permettant d'identifier les molécules ayant les propriétés pour devenir un médicament efficace et sûr pour les patients.

Seuls seront testés chez l'animal les produits ayant été préalablement testés et validés *in vitro* et qui sont susceptibles d'être intéressants pour une efficacité thérapeutique.

Remplacement Etant donné la complexité des différentes pathologies existantes, il est difficile de prédire le potentiel thérapeutique d'une molécule uniquement sur la base de résultats *in vitro*. Il s'avère donc nécessaire d'utiliser un modèle animal, qui est un modèle complexe avec des tolérances intrinsèques, afin d'évaluer l'impact sur tous les organes. Avant de pouvoir tester l'efficacité des composés sur l'animal il convient de déterminer la tolérance de ces composés dans le modèle d'intérêt. Les animaux utilisés dans ce projet seront des rongeurs (souris et rats) car la physiopathologie dans ces deux espèces est considérée comme suffisamment prédictive de l'efficacité de composés chez l'homme.

Raffinement L'ensemble des gestes techniques sur les animaux seront réalisés en accord avec les standards validés par la structure en charge du bien-être animal (administration des composés, etc...). Dans le cas où l'administration de composé nécessite une chirurgie, une analgésie, un suivi adapté et des mesures post-chirurgicales sont mises en place pour prévenir la souffrance des animaux. Dans tous les cas, étant dans le contexte de première administration de composé non testé *in vivo*, les animaux sont observés toutes les deux heures pendant les 6 premières heures post-administration, les animaux sont pesés et observés chaque jour afin de déterminer un score clinique et d'euthanasier l'animal dès l'apparition de signes cliniques indésirables et de signes de souffrance. Ce suivi clinique est effectué par des techniciens formés et compétents. Si nécessaire les prélèvements d'organes/tissus sont réalisés après euthanasie ou sous anesthésie profonde au terme de laquelle l'animal ne reprend pas conscience. A la fin des études, certains animaux non impactés par les traitements pourront être réutilisés pour la formation du personnel.

Réduction Le nombre d'animaux requis pour ces études est le plus faible possible en fonction des objectifs de l'étude et la puissance statistique nécessaire. Pour les études de tolérance, le nombre d'animaux par groupe est généralement de 5. Durant les 5 ans de ce projet, le nombre total de rongeurs est de 25 000 répartis en 20 000 souris et 5 000 rats, permettant la réalisation de 200 études par an.

15185 Les ultra-violet (UV) sont connus pour affecter le développement de certains organismes aquatiques. Alors que les changements climatiques occasionnent une augmentation de la quantité UV arrivant sur terre, ce projet vise à mieux en comprendre les conséquences dans le bon déroulement du développement d'une espèce aquatique d'intérêt écologique et économique, la Seiche, *Sepia officinalis*. Les céphalopodes ont des comportements guidés visuellement. Les UV en affectant le développement des yeux et/ou du système nerveux peuvent occasionner des modifications de comportement. Les œufs de la seiche sont noirs car la capsule qui entoure l'embryon est imprégnée de mélanine au moment de la ponte. Cette capsule noire est supposée protéger des UV. En conditions naturelles, la femelle pond parfois des œufs blancs, sans mélanine, et les embryons se développent normalement. Le projet consiste à tester différents pourcentages d'UV-B 2% (taux d'UV-B « naturel »), 6% et 12%, pendant le développement sur trois séries d'œufs : des œufs naturellement noirs (SN), des œufs naturellement blancs (SB) et des œufs sur lesquels on aura ôté la capsule (SD) cette dernière série permettant de tester l'importance de la capsule dans la protection contre les UV. Ces pourcentages d'UV seront également testés après éclosion sur des juvéniles jusqu'à 3 semaines.

Notons que les embryons de poissons ne sont pas soumis à la réglementation mais qu'aucune indication n'est donnée pour les céphalopodes. Néanmoins, nous avons choisi de faire apparaître les embryons dans cette DAP et d'y faire figurer les informations relatives à la connaissance actuelle en ce domaine pour les adultes nous nous basons sur des publications répertoriant les conditions environnementales optimales pour le bien-être animal, et mentionnant des indicateurs de stress potentiel. Le projet consiste en 1) l'observation morphologique et comportementale des embryons et des juvéniles 2) l'évaluation de la neurogenèse 3) l'évaluation de l'expression de gènes impliqués dans le stress cellulaire. Pour atteindre ces objectifs, les embryons et les juvéniles seront euthanasiés, fixés et des organes prélevés.

Six femelles et six mâles adultes seront pêchés lors du retour des animaux sur les côtes et acclimatés à la station marine. Les animaux sont maintenus en circuit ouvert (eau de mer filtrée à 1mm) dans un bassin de 4m³ pendant toute la phase d'acclimatation, et nourris à satiété (crabes, crevettes). Les mâles et femelles en présence vont s'apparier naturellement. Chaque couple constitué est transféré dans un bac de reproduction (bac avec couvercle 500L) où sont fournis des caches et supports de pontes. L'opération sera renouvelée jusqu'à obtention de 6 couples reproducteurs.

Les pontes sont vérifiées lors des opérations d'entretien quotidien des bacs de géniteurs (nettoyage, nourrissage, observations), et les œufs sont récupérés puis mis en incubation. Les femelles pondent entre 800 et 1000 œufs avec un taux de fécondation variable. Mâles et femelles meurent après la ponte en condition naturelle : les géniteurs ayant pondu seront anesthésiés puis euthanasiés. Des organes sont prélevés cerveaux, lobes optiques, yeux et peau permettant d'évaluer l'effet des UV sur ces organes.

Les œufs sont maintenus en circuit ouvert (eau de mer filtrée 5 µm) en conditions contrôlées de température (18°C), de salinité (35 g/l en conditions naturelles) et en photopériode 12h jour/12h nuit. Les UV-B 0%, 2%, 6%, 12% (+ un contrôle lumière artificielle-ampoules classiques sans UV) sont appliqués à partir du stade 23 (stade auquel l'embryon sans capsule peut se développer) sur les trois séries d'œufs. Pour la série sans capsule (SD), la capsule noire externe est retirée en laissant la membrane protectrice transparente autour de l'embryon dont l'environnement n'est ainsi pas modifié. La comparaison entre les différentes conditions permettra d'estimer l'importance de la capsule noire dans la protection contre les UV-B au cours du développement et les conséquences des UV-B chez le juvénile après éclosion, sur le plan du stress cellulaire et la morphogenèse.

Le nombre d'œufs prélevés avant éclosion sera de 20 à chaque stade, soit 120 pour chaque condition, donc 600 œufs pour une série. Le nombre de juvéniles éclos sera de 20 pour chaque stade de croissance (1,2,3 semaines) soit 60 pour une condition de lumière, donc 300 juvéniles pour une série. Pour chaque série, (SN, SB, SD) un total de 1000 œufs est nécessaire, tenant compte des œufs éventuellement non fécondés (estimés à 10%) et des nécessaires réplicas. Les juvéniles naturellement éclos seront dans des bacs adaptés (aquarium de 20L) avec un enrichissement environnemental adapté, et nourris à satiété avec des proies vivantes (crevettes).

Le nombre total mis en expérimentation pour une série donnée sera donc de 1000 œufs, soit 10% de plus que nécessaire afin de compenser les œufs non fécondés. Pour les trois séries, 3000 œufs seront utilisés et 12 géniteurs adultes.

Trois procédures sont prévues l'euthanasie des adultes/juvéniles de seiches, l'application des UV aux embryons/juvéniles, et l'étude comportementale des juvéniles.

Cette étude permettra de mesurer les conséquences d'une augmentation des irradiations UV chez un animal aquatique. Cette étude respecte la règle des 3R

-Remplacement l'expérimentation envisagée nécessite l'organisme dans son entier et le prélèvement des structures nerveuses et sensorielles impliquées dans les comportements. Les céphalopodes possédant des structures cérébrales et visuelles analogues à celles des Vertébrés, et uniques au sein des « non-vertébrés », il n'est pas possible de remplacer par une espèce non concernée par la réglementation.

-Réduire L'effectif en géniteurs est réduit à son minimum afin de garantir une production en œufs suffisante pour assurer la totalité des prélèvements lors de l'expérimentation. Le nombre d'œufs/juvéniles mis en expérimentation est le minimum nécessaire aux analyses ultérieures.

-Raffinement Un enrichissement environnemental varié sera mis à disposition des animaux avec un respect du comportement naturel (proies vivantes) chez les géniteurs et les juvéniles. Un personnel formé et expérimenté sera mis à disposition tout au long de l'étude.

15186 La réglementation internationale impose aux laboratoires pharmaceutiques d'effectuer des contrôles qualité d'efficacité et d'innocuité sur chaque lot de vaccin produit.

Ce projet porte sur l'évaluation sur animaux de l'immunogénicité des vaccins destinés à l'homme qui est l'une des méthodes prescrites pour les contrôles d'efficacité. Un test d'immunogénicité consiste à administrer un vaccin à des animaux, les héberger pendant la période nécessaire à l'obtention d'une réponse immunitaire, puis à recueillir le sang qui sera analysé par des méthodes *in vitro* pour la recherche d'un ou plusieurs types d'anticorps.

Ce projet décrit les essais réalisés systématiquement (exigence réglementaire) sur chaque lot de vaccin produit en routine, concerné par cette méthode de contrôle qualité. Il concerne également un test de raffinement et de réduction qui est en cours de développement. Enfin, il concerne tous les tests de contrôle nécessaire dans le cadre de la production et de la commercialisation des vaccins.

Les espèces employées pour ces tests sont la souris et le cobaye. Il est estimé qu'au cours de ce projet, mené sur une durée de 5 ans, 30 000 souris et 150 000 cobayes seront utilisés.

Les bénéfices attendus pour ce projet sont la mise sur le marché des lots de vaccins protégeant efficacement les populations et conformes aux spécifications et aux textes de référence. Toutes les procédures incluses dans le projet sont de degré de gravité léger à modéré (Les seules signes cliniques observés sont des réactions locales au niveau du site d'injection) Si un animal venait à présenter des signes cliniques, il serait pris en charge par un vétérinaire. L'ensemble des animaux utilisés pour ce projet est euthanasié selon des méthodes recommandées par la réglementation et approuvées par le Comité d'Ethique et la Structure de Bien-être Animal dont relève l'Etablissement Utilisateur.

Mise en œuvre des 3Rs

Remplacement - Les tests suivants ont été remplacés par des tests *in vitro* ou arrêtés

- Test d'immunogénicité des vaccins contenant la valence hépatite A inactivée chez la souris.
- Test d'immunogénicité des vaccins contenant la valence Haemophilus chez la souris
- Test d'immunogénicité des vaccins contenant la valence hépatite B chez la souris

Réduction : Le schéma expérimental des tests de ce projet a fait l'objet d'une revue par des biostatisticiens afin de calculer au plus juste le nombre d'animaux à utiliser tout en restant en accord avec les exigences réglementaires. Le test d'immunogénicité des valences diphtérie, tétanos et pertussis acellulaire chez le cobaye est en cours de déploiement pour un produit et permettra d'ici

fin 2020 le contrôle de 3 valences simultanément sans multiplier le nombre d'animaux. Ce test permettra de diminuer le nombre d'animaux utilisés pour la procédure 1 de ce projet et de remplacer 2 procédures dans le projet relatif aux tests réglementaires des tests d'activité.

Raffinement : Les animaux sont hébergés en groupe dans des cages contenant des dispositifs d'enrichissement dans des locaux appropriés, conformes aux standards réglementaires et suivis par un personnel spécifiquement formé. De plus Le test d'immunogénicité des valences diphtérie, tétanos et pertussis acellulaire chez le cobaye permettra de réduire le niveau de gravité.

15187 La malbouffe (junk food) désigne des aliments gras et sucrés, à la fois appétissants et très caloriques.

En favorisant l'obésité, le diabète ou les maladies cardio-cérébro-vasculaires, elle constitue un problème majeur de santé publique. La malbouffe présente des fortes similitudes avec les drogues d'abus (cocaïne, amphétamine) elle agit sur le système de récompense, un circuit neuronal utilisant le neuromédiateur dopamine. Cette action entraîne, comme pour les drogues, le développement de comportements compulsifs et de troubles psychiatriques. Découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques représente donc un défi majeur pour protéger le cerveau et notre santé.

L'axe intestin-cerveau, système de communication nerveuse entre l'intestin et le système nerveux central (SNC), représente un acteur physiologique majeur dans la compréhension des processus homéostatiques de l'organisme. Cet axe assure ses fonctions grâce à plusieurs voies telles que les voies neurale, endocrinienne, immunitaire et métabolique. Récemment, l'axe intestin-cerveau a été impliqué dans la mise en place de comportements de type addictif (malbouffe et drogues d'abus).

Cependant, les mécanismes sous-jacents restent inconnus.

Parmi les composantes structurelles de cet axe, le nerf vague jouerait un rôle clé dans la communication entre la périphérie et le SNC. Ce projet de recherche vise à spécifiquement étudier le rôle du nerf vague dans la mise en place de comportements hédoniques (nourriture et drogue d'abus) ainsi qu'à disséquer les circuits permettant l'adaptation des besoins homéostatiques. Nous envisageons d'étudier son rôle à travers la technique de vagotomie (VGX) et de bypass gastrique Roux-en-Y (BGRY). Nous voulons à présent utiliser des approches innovantes et diversifiées, de l'échelle de la synapse jusqu'au comportement, afin de décrypter le rôle du nerf vague dans la modulation du système de récompense.

Les résultats de ce projet pourraient faire émerger de nouvelles approches thérapeutiques pour lutter contre les troubles alimentaires et l'addiction. Nous utiliserons pour cela 370 souris. Si lors des premières procédures il s'avère que seule la technique VGX joue un rôle dans les circuits hédoniques et homéostatiques nous ne ferons pas la technique de RBGY et réduirons le nombre d'animaux à 330.

Les souris générées seront utilisées pour effectuer des études de comportement ainsi que des études d'exploration métabolique. Ces groupes expérimentaux seront aussi utilisés pour des études de calorimétrie indirecte. Nos protocoles ont été mis au point de façon à veiller au bien-être animal en respectant la règle des 3R, en réduisant le nombre d'animaux, en remplaçant si possible par d'autres techniques ne nécessitant pas d'animal, et en raffinant nos protocoles, cela en améliorant leur environnement et en surveillant leur état de santé notamment nous chercherons à éviter et limiter la douleur et la souffrance, à assurer des soins adéquats s'ils s'avèrent nécessaire, à appliquer les points limites établis préalablement et, enfin, à utiliser les procédures réglementaires et appropriées de mise à mort.

15188 La sclérose latérale amyotrophique (SLA) et la démence fronto-temporale (DFT) sont deux maladies neurodégénératives fatales qui restent actuellement incurables. Le risque de développer ces maladies au cours de la vie est de 1/1000. Des analyses anatomopathologiques ont montré que les patients souffrant de la SLA et de DFT présentent trois types d'inclusions protéiques impliquant les protéines TAU, TDP-43 ou FUS. La protéine FUS est constituée de plusieurs domaines parmi lesquels le domaine Nuclear Localization Sequence (NLS). Ce domaine est responsable de l'import de la protéine FUS depuis le cytoplasme où elle est synthétisée, vers le noyau. La majorité des

patients souffrant de SLA liée à une mutation de FUS présente une mutation dans ce domaine NLS. La protéine FUS est alors retrouvée majoritairement dans le cytoplasme. Nous avons récemment caractérisé une souris transgénique présentant une délocalisation globale de la protéine FUS (les souris FUS delta NLS). De manière intéressante, la présence de la mutation sur les deux allèles est létale chez l'animal nous forçant ainsi à l'utilisation d'animaux présentant la mutation FUS sur une seule allèle. Il est important de noter que les mutations du gène FUS chez le patient est associée avec des formes juvéniles de SLA à progression rapide ce qui ne semble pas être observé dans notre modèle FUS delta NLS.

Par conséquent nous tirons avantage d'un modèle de souris transgénique où la mutation FUS peut-être induite de manière homozygote dans un type cellulaire particulier. Nous interrogerons alors si la délocalisation de FUS dans les interneurons corticaux et spinaux est suffisante pour le développement de symptômes moteurs et cognitifs. Les souris sont laissées à plusieurs par cage et un enrichissement sera mis à disposition. Les techniques que nous utiliserons pour avancer dans ce projet sont déjà mises au point et utilisées de manière courante dans notre laboratoire. Dans la perspective du respect de l'approche des 3 R, nous avons de plus réduit le nombre de souris utilisées. Nous proposons d'utiliser un total de 106 souris. La compréhension des mécanismes à l'origine de la délocalisation de FUS dont la conséquence est pathologique, pourrait permettre de développer de nouveaux traitements qu'il serait possible de proposer aux patients pour affronter cette maladie jusqu'alors incurable.

- Remplacer La modélisation de la SLA/DFT nécessite la présence d'un réseau nerveux complet (terminaisons nerveuses, nerfs, moelle épinière et cerveau), il n'est pas possible de remplacer le modèle murin par des modèles *in silico* ou *in vitro*. Nous allons réaliser une étude comportementale longitudinale de ces souris pour évaluer la coordination motrice.

- Réduire : Grâce à une connaissance du modèle associée à la puissance du test statistique utilisé, nous considérons que 8-10 animaux par groupe expérimentaux sont suffisants pour observer ou non un effet significatif. De plus, l'utilisation d'animaux consanguins limite la variabilité phénotypique.

- Raffiner : Les animaux sont maintenus en groupe social dans un environnement enrichi (nid, matériel à ronger.). Basée sur une échelle de scorification, nous attribuerons pour chacun des items (détaillé en annexe) un score correspondant à l'absence ou présence du trouble considéré. Nous serons ainsi attentifs à l'aspect général des animaux en observant un ensemble des critères d'altération générale détaillés dans l'annexe de cette saisine.

15189 La sclérose valvulaire aortique c'est-à-dire le rétrécissement de l'ouverture de la valve aortique aboutit généralement à une insuffisance cardiaque. Le remplacement de la valve native par une valve mécanique ou bioprothétique (fabriquée à partir de tissus d'origine animale) est la seule prise en charge efficace possible à ce jour. Cependant, il peut se produire une dégénérescence de la valve bioprothétique, associée à une infiltration cellulaire. Cette dégénérescence peut conduire à une deuxième opération des patients.

Ce projet s'intéresse aux propriétés angiogéniques des différentes cellules des valves et leur rôle potentiel dans la dégénérescence des valves natives et bioprothétiques. L'étude de l'angiogenèse, c'est-à-dire de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, nécessite l'utilisation d'un organisme entier en raison de la complexité des interactions entre les cellules et le milieu environnant. Il s'agit d'un complément indispensable aux études effectuées *in vitro* par des techniques de culture cellulaire.

Nous utiliserons un modèle d'implant injecté au niveau dorsal en sous-cutané chez la souris. Ces implants contiendront différentes combinaisons des types de cellules isolées à partir de valves natives et bioprothétiques. 10 jours après l'implantation des implants, ces derniers seront retirés pour analyse.

Cette étude, prévue sur 5 ans, portera sur 85 souris au total.

Afin de limiter le nombre d'animaux utilisés, chaque souris recevra deux implants. De plus, certaines conditions expérimentales, telles que le nombre de cellules par implant ont été déjà déterminées par d'autres projets. Pour limiter la douleur et la souffrance des animaux, l'ensemble des procédures

seront effectuées sous anesthésie générale et les souris seront régulièrement surveillées, avec des points limites définis, afin de pouvoir prendre en charge précocement toute douleur ou souffrance. Des antalgiques sont prévus en cas de nécessité et un niveau de souffrance trop élevé entraînerait l'euthanasie anticipée de l'animal.

Malgré l'existence de nombreux modèles *in vitro* évaluant les différents processus impliqués dans l'angiogenèse, l'utilisation de modèles *in vivo* reste indispensable en raison des nombreuses interactions cellulaires complexes entre les cellules et leur environnement qui permettent la génération de vaisseaux fonctionnels.

A terme, ce projet permettra d'étudier la capacité des cellules de valves à former des vaisseaux sanguins fonctionnels *in vivo* afin de mettre en évidence de nouveaux mécanismes physiopathologiques participant à la sclérose valvulaire aortique.

15190 Le cerveau est une véritable machine d'analyse, détectant constamment des changements dans l'environnement extérieur (auditif, visuel, somato-sensoriel). Seulement, les mécanismes cognitifs à l'origine du traitement de ces données sont mal connus.

Dans ce projet, des séquences de stimulations sont appliquées pour détecter et analyser le comportement du cerveau face à des changements de l'environnement extérieur (lumière, son) . Grâce aux techniques d'IRMf (IRM fonctionnelle) à haut champs, il est possible de localiser avec une grande précision les aires cérébrales d'analyse. Ce type d'expériences a déjà été réalisé à des fins d'analyses intégratives, pour des stimulations auditives. Ici, il s'agit d'élargir la question à d'autres stimulations, cette fois à des fins d'analyses cognitives et de localisation d'aires de traitement. Les données obtenues lors de ces expériences serviront à identifier les zones d'intérêts, les observer avec des techniques d'imagerie plus précises, et ainsi mieux comprendre les différents fonctionnements du cerveau.

L'IRMf à l'avantage d'être une technique non-invasive qui permet de visualiser le cerveau entier. Aucune culture cellulaire ou programme informatique ne peuvent remplacer le cerveau de l'animal en fonctionnement. C'est pourquoi, pour mener à bien ce projet, 48 rongeurs, nés et élevés dans des établissements agréés à des fins scientifiques, seront utilisés. Ce nombre a été calculé au plus juste afin d'obtenir des résultats fiables après les différentes stimulations et conditions d'anesthésie. Plus précisément, nous utiliserons trois différents types de stimulations (sonore, visuelle, somato-sensoriels) et quatre types d'anesthésie (medetomidine, kétamine, propofol, sufentanil). Les stimulations seront réalisées dans le scanner à l'aide d'appareils et de paradigmes dédiés. Pour la stimulation acoustique, un haut-parleur électrostatique sera utilisé pour délivrer un signal acoustique dans l'aimant pendant l'IRM. Pour la stimulation visuelle, des images présentant un fort contraste seront présentées sur un écran placé devant l'animal à l'aide d'un vidéoprojecteur. Enfin, les stimulations somato-sensoriels seront présentés à l'animal à l'aide de deux motifs en relief (sinusoïdale et carré) qui touchent leurs vibrisses. Chaque animal sera soumis à l'IRM à deux reprises, une fois sous anesthésie et une fois éveillé (après avoir été habitué au scanner). Une séance d'IRM durera au maximum 3 heures et l'intervalle entre les sessions sera d'au moins une semaine.

Tous les animaux sont hébergés en groupe. Un enrichissement du milieu de vie est systématiquement ajouté dans chaque cage afin de diversifier les interactions de l'animal. Pour éviter toute douleur ou souffrance de l'animal, des protocoles analgésique et anesthésiques sont mis en place après avis vétérinaire.

15191 Les virus - comme le virus de la grippe - sont des pathogènes intracellulaires obligatoires pour pouvoir se répliquer, ils doivent infecter une cellule-hôte dont ils détourneront le métabolisme et les constituants à leur profit. Notamment, les virus utilisent la machinerie de synthèse protéique de la cellule-hôte afin de produire en grande quantité les protéines virales indispensables à la formation de nouveaux virus infectieux. L'augmentation massive de la synthèse protéique va entraîner un afflux de protéines dans la lumière du réticulum endoplasmique (RE), produisant un stress du RE.

Afin de rétablir l'homéostasie du RE, un ensemble de voies de signalisation s'active la réponse UPR (unfolded protein response).

Le virus influenza est responsable de la grippe une maladie infectieuse des voies respiratoires très contagieuse. Généralement bénigne, la grippe peut entraîner de graves complications, parfois mortelles, chez les personnes âgées (65 ans et plus). La littérature rapporte que l'infection par le virus de la grippe entraîne un stress du réticulum endoplasmique dans les cellules épithéliales pulmonaires, activant une réponse UPR essentielle aux premiers stades de la réplication virale. Nos plus récents résultats montrent que ce virus peut également infecter les préadipocytes et les adipocytes cellules majoritaires du tissu adipeux. Cependant dans ces cellules, le cycle viral est interrompu au stade final de relargage de nouveaux virus. De manière intéressante, la réponse UPR induite dans les préadipocytes et les adipocytes diffère de celle observée dans les cellules épithéliales pulmonaires laissant présager un rôle de la réponse UPR également dans les stades tardifs du cycle viral.

En dépit de ces données obtenues *in vitro*, le rôle de la réponse UPR dans la physiopathologie de l'infection grippale, notamment chez les personnes âgées (chez lesquelles cette réponse est compromise), n'a jamais été étudié *in vivo* dans des modèles animaux.

Dans ce projet, nous nous proposons de comparer les voies de la réponse UPR (voies IRE1, PERK et ATF6) qui sont induites par l'infection par le virus de la grippe (virus influenza de type A, sous-type H3N2) dans les poumons et les tissus adipeux de souris (C57BL/6 mâles) jeunes adultes (7-8 semaines) ou très âgées (18 mois).

Le projet mettra en oeuvre 2 procédures expérimentales

- Procédure 1 Infection de souris par le virus influenza classe modérée. Cette procédure a été approuvée par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche pour d'autres projets de notre équipe, et aucun changement n'y sera apporté.

- Procédure 2 Inhibition *in vivo* des voies IRE1, PERK et ATF6 classe légère.

Lors de la conception du projet, nous avons cherché à respecter les principes des 3R (1) "Réduction" du nombre d'animaux en expérimentation seules les expériences qui ne peuvent être remplacées par des méthodes alternatives seront réalisées, les données statistiques obtenues lors de nos expériences préalables nous ont permis d'estimer le nombre d'animaux nécessaire et suffisant à l'obtention de résultats statistiquement exploitables, et les procédures utilisées sont publiées et admises par la communauté scientifique, ce qui permettra la reconnaissance réciproque des résultats. (2) "Raffinement" des procédures expérimentales afin de réduire tout stress ou souffrance de l'animal, de son arrivée à l'animalerie à son sacrifice les souris seront hébergées en animalerie agréée, avec enrichissement de leur environnement et surveillance régulière par le personnel de l'animalerie, les animaux seront manipulés individuellement et à distance des animaux non manipulés afin de limiter toute détresse/angoisse chez ces derniers. Par ailleurs, le suivi régulier de l'attitude corporelle, de l'aspect du pelage et du poids corporel permettra d'identifier tout signe de souffrance éventuelle (Points limites définis en fonction de la connaissance, par notre équipe, du modèle d'infection de souris par le virus de la grippe = perte de poids >15%, perte d'alimentation et/ou de consommation hydrique brutales et durables, plaies). (3) "Remplacement" les études préalables *in vitro* ont d'ores et déjà été réalisées et ont montré que chacune des 3 voies de la réponse UPR est impliquée dans la réponse à l'infection par le virus de la grippe (littérature et nos travaux). Cependant, l'étude du rôle de la réponse UPR dans la physiopathologie de l'infection grippale chez des souris jeunes adultes ou âgées n'a jamais été réalisée et ne peut être modélisée par des méthodes alternatives à l'utilisation d'animaux vivants.

Sur la période de 5 ans, 2740 souris seront nécessaires pour atteindre nos objectifs.

15192 Le syndrome transfuseur-transfusé (STT) touche 15% des grossesses gémellaires monochoriales où un unique placenta est partagé par les deux fœtus. Il est causé par des anomalies vasculaires au niveau du placenta aboutissant à un déséquilibre sanguin chez les jumeaux. Cette pathologie donne 80% de mortalité fœtale en l'absence de traitement et constitue la principale cause de décès et handicap chez les jumeaux.

Le traitement de référence est chirurgical grâce à la fœtoscopie. Elle vise à détruire, in utero, les anomalies vasculaires uniquement superficielles par laser. Les difficultés d'accessibilité aux anomalies profondes empêchent une réussite du laser dans plus de 30% des cas. Ce geste difficile présente un risque important de rupture prématurée des membranes et d'accouchement prématuré qui compromet le pronostic foetal.

Les ultrasons focalisés de haute intensité (HIFU) permettent de concentrer l'énergie des ultrasons sur une toute petite zone conduisant à une élévation thermique parfaitement maîtrisée en termes de localisation et d'intensité ce qui confère à la technique une efficacité thérapeutique démontrée cliniquement, par exemple pour traiter l'adénocarcinome de la prostate. Une coagulation est obtenue par effet thermique, à distance du transducteur, sans incision de la peau. Ces HIFU permettent des insonifications de haute précision conduisant à une occlusion vasculaire sélective.

L'objectif de notre projet de recherche translationnelle est de démontrer la faisabilité, l'efficacité et l'innocuité des HIFU sur un modèle de macaque gestante de plus de 60 jours en oblitérant de manière sélective les vaisseaux placentaires ciblés grâce au flux doppler couleur.

En mettant en évidence ce potentiel thérapeutique et son innocuité materno foetale, nous aimerions proposer, in fine, une solution alternative au traitement du STT pour les grossesses avec placenta antérieur mais également pour d'autres applications obstétricales (autres anomalies placentaires, tumeurs fœtales, interruption sélective de grossesse).

Un modèle animal est nécessaire avant d'entreprendre des essais cliniques chez l'homme. Les femelles seront enceintes d'un unique foetus. Ce modèle, très proche anatomiquement de l'Homme, est maîtrisé. Cependant, il n'a jamais été mis en évidence la possibilité de séparer le placenta en deux parties distinctes avec les HIFU. Nous aimerions, au travers de ce projet, démontrer notre capacité à scinder ce placenta en deux par des insonifications rapprochées en évaluant l'innocuité materno foetale immédiate, puis à distance avec naissance du foetus 7 jours après l'essai. Afin de garantir des résultats statistiquement pertinents, ce projet de recherche translationnelle comprend 2 procédures de gravité modérée en mettant en oeuvre 9 guenons gestantes sur une durée de 4 ans.

Pour la première procédure, le traitement sera réalisé sur la femelle pendant sa césarienne sous analgésie et anesthésie générale ce qui permettra l'analyse du placenta en fin de chirurgie. Dans la seconde procédure, elle aura bénéficié 7 jours auparavant d'une application HIFU sous anesthésie générale et analgésie. La vitalité du foetus sera surveillée par échographie entre la procédure expérimentale et la césarienne.

Le bon rétablissement de la femelle sera surveillée en post opératoire. La constatation d'effets secondaires sur les femelles brulure cutanée, douleurs non soulagées par des antalgiques, déficit neuro-musculaire, atteinte d'organes (digestive, vésicale, vasculaire) mettrait fin à l'étude. Les animaux concernés par ce projet ne sont pas mis à mort à la fin de la procédure.

La mise en évidence de l'efficacité des HIFU sur placenta humains ex vivo a été démontré. Il n'existe pas de modèle STT à l'échelle animale, raison pour laquelle le modèle animal étudié doit être proche de celui de l'Homme que ce soit à l'échelle anatomique ou gestationnel. Cette étape est nécessaire pour démontrer la possibilité d'une séparation du placenta avant une application clinique chez l'homme devant l'absence d'alternative non animale. Le modèle de macaque gestante semble le plus adapté puisqu'il présente des caractéristiques anatomiques et gestationnelles proche du modèle humain. Aucun autre modèle animal ne permet de simuler précisément la paroi abdominale maternelle (peau, graisse, muscle, aponévrose, myomètre) sans interposition d'intestin entre l'utérus et la paroi abdominale antérieure. La réduction repose sur l'étude d'animaux inclus dans le protocole d'une étude pré existante déjà autorisée, et donc de ne pas ajouter de nouveaux animaux pour ce projet. Un entraînement préalable et régulier aux insonifications sera réalisé sur placentas humains et simiens ex-vivo. Le raffinement est assuré par l'anesthésie générale de l'animal durant la séquence HIFU, l'antalgie adaptée per et post-opératoire et l'évaluation du bien-être animal grâce à une fiche de cotation en s'assurant de replacer l'animal dans un environnement social.

15193 La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est une maladie de la rétine provoquée par une dégénérescence progressive de la macula, partie centrale de la rétine, qui apparaît le plus souvent à partir de 65 ans. En France, environ 1,5 millions de personnes seraient atteintes de DMLA. C'est la principale cause de cécité non corrigeable chez les personnes âgées dans les pays industrialisés.

Les causes précises de cette maladie ne sont pas connues et les mécanismes peu compris. Il existe deux formes de DMLA atrophique et exsudative. La forme atrophique ou « sèche » est essentiellement caractérisée par une dégénérescence rétinienne responsable de la perte de vision irréversible. La forme exsudative (ou "humide") correspond à l'apparition de nouveaux vaisseaux sanguins au niveau de la choroïde qui, à terme, peuvent provoquer des hémorragies sous-rétiniennes et accélérer l'évolution vers la cécité. Les traitements existants permettent seulement de ralentir l'évolution de la formation et la croissance de nouveaux vaisseaux et donc uniquement la forme humide de la pathologie alors que aucun traitement n'est disponible pour la forme sèche de la DMLA. Invariablement, dans les 2 formes de la pathologie, un processus inflammatoire est présent caractérisé par l'infiltration et l'accumulation de cellules inflammatoires participant de manière importante à la dégénérescence de la rétine. Il est nécessaire aujourd'hui d'une meilleure compréhension de ces mécanismes inflammatoires pour enfin trouver de nouvelles cibles thérapeutique

L'objectif de ce projet est de décrypter les mécanismes de la mobilisation des monocytes spléniques, décrit comme participant à l'inflammation sous-rétinienne, au travers notamment de l'activité du nerf vague qui irrigue la rate.

Nous étudierons ces mécanismes sur des souris âgées et des souris sur lesquelles nous induirons une inflammation sous-rétinienne via une exposition des animaux à une lumière ou des impacts laser sur les vaisseaux de la rétine.

Ces expérimentations seront menées sur des modèles murins présentant une prédisposition à développer des inflammations sous-rétiniennes et des souris normales.

Au total, 2952 animaux seront nécessaires à cette étude en incluant les contrôles.

L'utilisation de l'animal est indispensable dans ce projet la DMLA est le résultat d'une interaction complexe entre différents types cellulaires juxtaposés et ne peut être complètement modélisée par des modèles cellulaires *in vitro*. Conformément à la « règle des 3R » décrite au 2° de l'article R214-105, nous avons limité au maximum le nombre d'animaux nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement interprétables. Les animaux seront examinés quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié de l'animalerie et seront hébergés dans les conditions conformes à la réglementation. Ils bénéficieront si besoin d'une anesthésie générale. Pour les procédures de chirurgies, la douleur sera prévenue par administration d'opioïdes en pré et post opératoire. Une signalétique particulière des animaux en expérimentation est utilisée. Elle permettra une surveillance plus adaptée selon les procédures afin de s'assurer de leur bien-être.

15194 Le Bisphénol A (BPA) a été reconnu comme perturbateur endocrinien. Son utilisation étant maintenant interdite dans les emballages alimentaires et les tickets de caisse, les industriels l'ont remplacé par des analogues structuraux pour ses différentes applications, dont ces emballages alimentaires et papiers thermiques. Cependant, des études *in vitro* ont montré que certains analogues structuraux pourraient présenter un risque pour la santé humaine si leur potentiel d'exposition est plus important que celui du BPA. Or, les mécanismes toxicocinétiques qui déterminent l'exposition interne de l'Homme aux bisphénols analogues du BPA ne sont pas connus.

Les propriétés pharmacocinétiques peuvent être liées à la structure de la molécule. Notre hypothèse est que les propriétés physico-chimiques et chromatographiques des différents bisphénols pourraient permettre de prédire leur potentiel d'exposition. Nous proposons donc de développer une approche QSAR, ie. Relations Quantitatives Structure-Activité, pour établir une relation entre les propriétés physico-chimiques et chromatographiques des bisphénols avec leurs paramètres pharmacocinétiques pour caractériser les processus d'absorption orale et les modalités d'élimination des analogues du BPA.

Cette approche QSAR nécessite de déterminer les paramètres toxicocinétiques de certaines molécules analogues du BPA. Elle requiert l'administration d'un mélange de bisphénols à la fois par voie intraveineuse et extravasculaire (orale) et la réalisation de prélèvements de sang, d'urine et de fèces à un intervalle de temps régulier, cette procédure ne nécessite pas d'anesthésie. Etant donné que cette approche ne peut pas être mise en œuvre chez l'Homme, nous avons utilisé le porcelet au titre d'espèce animale pertinente pour l'Homme en termes d'absorption digestive. L'intérêt de cette espèce est également l'importance de sa volémie qui autorise les prélèvements de sang, d'urine et de fèces répétés, ce qui permet de réduire le nombre d'individus dans le respect des 3Rs et d'accroître la précision des mesures alors que les rongeurs ne peuvent être normalement prélevés qu'une seule fois. De plus, l'administration d'un cocktail de bisphénols au même animal permet de réduire considérablement le nombre d'animaux nécessaires.

Quatre porcs seront tout d'abord utilisés pour vérifier la tolérance des animaux à l'administration conjointe des bisphénols par voie orale et par voie intraveineuse. L'absorption orale des différents bisphénols sera ensuite évaluée sur un lot de 16 porcs pour documenter le devenir du mélange de bisphénols dans l'organisme et construire un modèle QSAR prédictif des paramètres pharmacocinétiques d'autres bisphénols.

Les porcelets seront issus d'un élevage et seront hébergés en groupe dans des boxes entre les périodes de mesure et un enrichissement sera obtenu à l'aide de ballons et de balles suspendues. Lors des mesures qui nécessitent la collecte de l'ensemble des fèces et des urines émises, les porcelets seront placés dans des cages à métabolisme pendant 24 h et auront un contact visuel avec leurs congénères pour limiter l'impact de leur isolement.

Les administrations intraveineuses seront réalisées via un cathéter placé dans une des veines de l'oreille. Il ne sera pas fait plus de deux essais de pose de cathéter par oreille.

Après chaque prélèvement sanguin, de la glace sera maintenue sur la zone de prélèvement afin d'éviter tout hématome.

Un cycle lumineux sera mis en place avec de la lumière de 7h à 19 h, la température sera maintenue autour de 25°C à l'aide de radiateurs et une visite sera faite au moins une fois par jour.

15195 En cancérologie, la radiothérapie est une des thérapies conventionnelles qui est proposée à tous les stades de la maladie des tumeurs de la prostate. Or, très peu de choses sont connues sur les mécanismes de réponse et de mise en place de résistance (30 à 40% des cas) à la radiothérapie des cellules de cancer de la prostate.

L'objectif de ce projet est de comprendre la fonction d'un facteur de transcription dans la réponse à l'irradiation ce qui requière l'utilisation d'animaux. Nous avons décrit ce facteur comme pro-tumoral au stade primaire et au stade métastases osseuses et il est maintenant connu pour intervenir dans les résistances à la chimiothérapie. Dans le cadre de l'identification de bio-marqueurs de réponse à la radiothérapie qui permettrait d'identifier très tôt les bons répondeurs, nous avons décidé d'étudier ce facteur de transcription. Ceci requière des études *in vitro* mais aussi *in vivo* avec des modèles de cellules de cancer de la prostate modifiés pour l'expression de ce facteur qui ont dans le passé fait l'objet d'agréments antérieurs.

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 de 3 modèles de tumeurs primaires (cellules injectées dans le lobe dorso-latéral gauche) +/- irradiation sera réalisée (nombre réduit de souris n=42). Si cette approche ne s'avère pas satisfaisante, une autre étude pilote sera réalisée (cellules injectées en sous-cutané) +/- irradiation (nombre réduit de souris n=27). Par la suite, afin d'étudier l'impact de notre facteur d'intérêt dans la réponse à la radiothérapie dans les tumeurs primaires, les statistiques ont été employées pour réduire au maximum le nombre d'animaux. Ceci nous a conduit à un calcul final de 420 animaux sur 5 ans (10 animaux par groupe, 6 groupes (contrôle et sur-exprimant notre facteur d'intérêt; +/- irradiation) + 1 groupe dominant négatif (-/+ irradiation) sur 2 protocoles d'irradiation. L'expérience statistique sera réalisée deux fois si la significativité statistique n'est pas obtenue lors de la première étude statistique (2x210). Le nombre d'animaux (489) par lot a été optimisé en fonction des protocoles et agréments antérieurs.

Concernant le raffinement, pour réduire la douleur, toutes les précautions seront prises pour que l'animal ne souffre pas -par l'utilisation d'anti-douleurs (au cours des injections et dès que les animaux présentent des signes de douleur légère ou modérée) en aucun cas les animaux seront maintenus en vie en cas de douleur sévère et seront mise à mort -pour leur confort, les animaux seront hébergés en groupes invariables (5 par cage maximum) dans un environnement propre, eau filtrée non stérile, alimentation, litière) dans des cages avec portoirs ventilés qui seront continuellement mise en pièce en surpression afin d'éviter toutes infections avec enrichissement et surveillance active. Les greffes seront réalisées sous anesthésie gazeuse avec analgésique en pré et post-opératoire - dans un environnement enrichi des cages pour le bien-être des animaux -par l'utilisation systématiquement d'anesthésies (-quelque soit les procédures et avant la mise à mort) – par des temps d'acclimatation nécessaire pour diminuer au maximum le stress des animaux pouvant être engendré lors d'un changement de location (animalerie, pièce d'analyse). La température des animaux sera maintenue grâce à l'utilisation de tapis chauffants. Le niveau de propreté requis pour les procédures sera respecté, les injections et les suivis de protocoles sous la responsabilité du porteur de projet (Niveau 1). Tout signes de stress (comportement, activité motrice, posture) seront pris en compte ainsi qu'une pesée quotidienne sera effectuée et les valeurs reportées pour chaque animal. Un suivi journalier sera aussi effectué par le personnel animalier. Le change sera réalisé une fois par semaine. Concernant des études de remplacement, les effets de ces facteurs pouvant être locaux (tumeurs) mais aussi impacter des cellules du microenvironnement et des organes à distance, cette phase d'expérimentation animale qui relève de la physiologie générale est nécessaire et ne peut pas être substituée par des tests sur des cellules *in vitro*.

15196 La domestication des animaux et des plantes a constitué un tournant majeur de l'histoire de l'humanité faisant passer l'homme du statut de chasseur cueilleur au statut d'agriculteur éleveur. Bien qu'une grande diversité d'espèces ait été domestiquée au cours des 10 000 dernières années, bon nombre des traits qui ont évolué au cours de la domestication sont partagés entre les différentes espèces. Ce phénomène a été appelé « syndrome de domestication », ce qui veut dire que les mammifères se caractérisent par des changements fréquents de comportement, de couleur de la robe et de traits morphologiques, tels que des oreilles tombantes.

Dans ce projet, nous visons à étudier les changements moléculaires sous-jacents aux oreilles tombantes. Bien que de grands progrès aient été réalisés dans l'identification de gènes associés à d'autres traits de domestication, la génétique de ce trait, que l'on peut trouver chez les lapins, les porcs, les chiens et les hamsters domestiques, reste inconnue. Le lapin sert ici d'espèce modèle.

Afin de démêler ses bases génétiques, nous proposons d'étudier les lapins domestiques. Chez le lapin, plusieurs races, caractérisées par de longues oreilles tombantes, offrent une occasion unique de cartographier les gènes sous-jacents en raison de leur grande facilité de manipulation et d'élevage. Dans ce projet, nous effectuerons des croisements entre une lignée de lapins à oreilles tombantes et des individus de type sauvage (oreilles dressées). Nous effectuerons ensuite un séquençage génomique complet pour identifier les régions du génome associées à ce trait. La découverte du déterminisme génétique des oreilles tombantes chez le lapin fournira des informations sans précédent sur un phénotype qui a évolué de façon similaire au sein de plusieurs espèces au cours de la domestication et permettra donc de tester des résultats récents selon lesquelles le syndrome de domestication résulte principalement de déficits cellulaires légers de la crête neurale au cours du développement embryonnaire. Dans une étude publiée en 2014 dans la revue *Science*, aucun gène majeur de domestication distinguant les lapins sauvages des lapins domestiques n'a été identifié mais de très nombreux polymorphismes (variations du génome), affectant des gènes impliqués dans le développement du système nerveux, ont été observés.

Dans ce contexte, nous proposons de générer 200 individus en une seule année, à partir de 2 mâles et de 18 femelles issus du croisement entre un mâle à oreilles tombantes et une femelle à oreilles dressées. Cet effectif permettra d'identifier les régions génomiques associées au trait. Les informations génétiques obtenues à partir du pedigree seront complétées par les données de séquençage du génome entier, déjà existantes pour plusieurs races de lapins présentant ou non ce trait. Cette combinaison de données dérivées d'arbres généalogiques et d'analyses génétiques

entre races permettra d'identifier les gènes sous-jacents avec un degré de preuves et de résolution élevé.

Réduction : Le nombre total d'animaux nécessaire est de 222 animaux. Un mâle à oreilles tombantes et une femelle à oreilles dressées (Génération 0=F0) produiront 2 mâles et 18 femelles croisés (Génération 1=F1). Ces deux mâles et 18 femelles croisés produiront 200 animaux à caractériser et à séquencer (Génération 2=F2). Après l'observation de leur phénotype (oreilles tombantes ou dressées) à 70 jours d'âge, les 200 animaux de la F2 suivront le circuit classique de commercialisation.

Ce nombre d'animaux a été réfléchi de façon à obtenir un minimum de 25 animaux à oreilles tombantes parmi les 200 animaux de la F2. En utilisant la même méthodologie, un gène responsable d'une locomotion particulière du lapin « sauteur d'Alfort » a pu être identifié à partir de 12 animaux porteurs de la mutation mais la résolution de la cartographie n'était pas optimale et l'intervalle de recherche sur le génome était de 3000 bases (3 MB) ce qui a rendu très difficile la recherche de la mutation causale. En augmentant le nombre de méioses avec 25 animaux, la résolution de la cartographie sera meilleure et augmentera les chances d'identifier la mutation causale.

Remplacement Ce programme de recherche s'attache à étudier les mécanismes génétiques et comportementaux de la domestication. C'est pourquoi le recours à des animaux, élevés dans des conditions expérimentales proches de celles des élevages conventionnels pour reproduire un milieu conforme à celui dans lequel le processus de domestication a été réalisé, est nécessaire

Raffinement : Nos conditions expérimentales sont proches de celles des élevages conventionnels pour reproduire un milieu conforme à celui dans lequel le processus de domestication a été réalisé (mères et pères élevés en logements individuels, lapereaux élevés en logements collectifs). L'étude prévoit en effet d'étudier la relation entre le caractère oreilles tombantes et le comportement des animaux en conditions d'élevage conventionnel (comportement, docilité, interactions avec les congénères.

Les 20 animaux de la F1 et les 200 animaux de la F2 seront élevés de 35 à 70 jours dans des cages collectives équipées de blocs à ronger.

Les 19 femelles et 3 mâles de la F1 seront élevés dans des cages individuelles correspondant aux normes d'élevage afin de

- se rapprocher le plus possible de ce que l'on trouve sur le terrain et donc reproduire au mieux l'environnement d'élevage
- permettre aux femelles de s'occuper tranquillement de leurs portées sans avoir à les protéger des attaques des autres femelles lorsque celles-ci sont en groupes
- éviter les blessures que pourraient se faire les mâles lorsqu'ils sont élevés ensemble (morsures aux dos, aux yeux et aux oreilles)

Les animaux auront une double biopsie à une oreille en fin de croissance. Ceci est nécessaire pour extraire l'ADN de ces animaux. Un seul prélèvement (peau + cartilage) est réalisé sur l'animal. Le diamètre de la biopsie réalisé est de 3mm La biopsie est réalisée dans une boîte de contention, par du personnel qualifié, sur des animaux sereins pendant une opération qui n'excède pas 30 secondes.

15197 Le cerveau est composé de nombreux types de neurones communiquant entre eux via des contacts spécifiques appelés synapses. Chaque neurone peut être contacté par plusieurs types de neurones formant des synapses aux caractéristiques morphologiques et fonctionnelles distinctes. Le but de notre projet est de déterminer le rôle de l'activité neuronale dans le maintien de synapses fonctionnelles et spécifiques entre des types de neurones très variés. Ceci est essentiel à la compréhension du développement et du fonctionnement du cerveau, mais aussi à la compréhension de l'origine des maladies neurodéveloppementales comme l'autisme ou la schizophrénie, aujourd'hui considérées comme des maladies des synapses.

Notre hypothèse est que l'activité neuronale régule l'identité moléculaire spécifique à chaque type de synapse d'un même neurone cible, ce qui lui permet de se connecter et de maintenir sa connexion à un endroit précis sur sa cible et pas ailleurs. Notre système d'étude est le réseau formé entre deux régions du cerveau, l'olive inférieure et le cervelet (réseau olivo-cérébelleux), dans lequel la cellule de Purkinje forme différents types de synapses avec différents neurones ayant chacun un territoire propre. La mise en place et le maintien de ce réseau sont le résultat de processus développementaux complexes combinant des mécanismes génétiques et des mécanismes dépendants de l'activité neuronale. Des études précédentes réalisées chez le rat suggèrent l'importance de l'activité neuronale pour le maintien des connexions entre neurones de l'olive inférieure et neurones du cervelet sans pour autant en expliquer les mécanismes. Dans le but d'identifier les facteurs moléculaires potentiellement régulés par l'activité neuronale et responsables du maintien des connexions du réseau olivo-cérébelleux, nous bloquerons l'activité neuronale dans le cervelet en utilisant la pharmacologie. Pour cela, nous infuserons de manière chronique la tétródotoxine, une molécule qui bloque l'activité neuronale, dans une sous-région du cervelet de souris adultes. Nous analyserons ensuite les conséquences du blocage de l'activité au niveau morphologique, fonctionnel et moléculaire. Notre modèle d'étude est la souris car elle est devenue un modèle de choix pour l'étude des mécanismes moléculaires régulant les grandes fonctions biologiques. Elle permet l'analyse de ces mécanismes et des conséquences de leurs perturbations à différents niveaux chez l'animal comportemental, physiologique et moléculaire.

Dans ce projet, nous prévoyons l'utilisation de 400 souris adultes sur 5 ans. La règle des trois R [1) Réduction, 2) Raffinement, 3) Remplacement] est appliquée dans la mesure où 1) le projet est conçu pour limiter le nombre de souris au minimum dans la limite de ce qui est permis pour obtenir des résultats scientifiquement valides (détermination du nombre d'animaux grâce à l'outil statistique BiostaTGV). 2) 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 durable que pourraient ressentir les animaux. Ainsi, les animaux sont hébergés dans des cages contenant sciure, nid végétal qui constitue une forme d'enrichissement du milieu, nourriture et eau à volonté. Les techniques douloureuses et stressantes seront minimisées grâce à l'utilisation d'analgésiques et de techniques d'anesthésie lors des procédures invasives. De plus, le projet comprend une expérience pilote qui permettra de déterminer la dose optimale de tétródotoxine à infuser afin d'obtenir des conclusions solides avec des effets réduits au minimum pour les animaux, sachant que des déficits de fonctionnement du réseau olivo-cérébelleux peuvent conduire à des défauts de coordination motrice et de mouvements. Les souris manipulées seront observées chaque jour jusqu'à la fin des expériences. Tout signe de stress ou de douleur impliquera une élimination de la procédure expérimentale. 3) Le développement de connexions entre différentes régions du cerveau ne peut pas être reproduit par des systèmes cellulaires. En effet, nous avons tenté de réaliser des co-cultures de neurones du cervelet et de l'olive inférieure mais sans succès, et aucune publication scientifique n'a montré la faisabilité d'une telle co-culture. L'utilisation d'animaux vivants est donc nécessaire pour notre projet.

15198 Les astrocytes sont les cellules gliales majoritaires du cerveau. Ils possèdent une interface vasculaire qui consiste en des prolongements ou "pieds" qui vont au contact des vaisseaux sanguins cérébraux. A cette interface, les astrocytes régulent les fonctions vasculaires cérébrales. Ils maintiennent en particulier l'intégrité des vaisseaux sanguins cérébraux et le dialogue immunitaire entre le sang et le cerveau. Ils sont donc cruciaux pour le fonctionnement du cerveau. Cependant les modalités de ces régulations astrocytaires sont très mal connues alors même qu'elles sont altérées dans un grand nombre de pathologies cérébrales (ex : Maladie d'Alzheimer, Sclérose en plaques). L'intérêt d'étudier les interactions entre les astrocytes et le système vasculaire est donc in fine de pouvoir comprendre les mécanismes de ces pathologies et de proposer de nouvelles pistes thérapeutiques.

Notre projet a pour but d'étudier les interactions astrocytes-vaisseaux sanguins. Nous avons choisi de cibler notre étude sur MLC1 une molécule des astrocytes très enrichie dans les pieds astrocytaires périvasculaires. Le rôle de MLC1 dans les régulations astrocytaires périvasculaires

n'est pas connu. Nos données préliminaires obtenues sur un modèle de KO constitutif pour MLC1 (où le gène est inactivé dans toutes les cellules et ce dès la fécondation) indiquent que l'absence de MLC1 conduit à un développement anormal de l'unité gliovasculaire. Pour valider cette hypothèse, nous souhaitons caractériser l'unité gliovasculaire dans un modèle où MLC1 est inactivé à un stade tardif sur une unité gliovasculaire déjà mature.

Ce projet repose donc sur l'utilisation du modèle murin Aldh1CreERT2 Mlc1^{fl/fl} dans lequel l'inactivation par délétion du gène MLC1 peut être induite de façon spécifique dans les astrocytes par injection de tamixifène (induction de la délétion). Grâce à ce modèle, nous souhaitons caractériser l'interface entre astrocytes et vaisseaux sanguins en réalisant des caractérisations moléculaires biochimiques et histologiques. Nous estimons que nous utiliserons 618 animaux dans ce projet. Ce nombre nous permettra d'obtenir des données statistiquement exploitables et repose sur nos études précédentes validées.

Nos expérimentations seront menées sur une période de 5 années maximum sur la souris qui représente un très bon modèle d'étude du cerveau des mammifères. Le modèle murin est irremplaçable pour notre étude car il n'existe en effet pas de système *in vitro* reproduisant la structure complexe de l'interface entre astrocytes et vaisseaux sanguins. Notre projet repose sur des protocoles de purification de l'unité gliovasculaire et des observations histologiques réalisées à partir des cerveaux disséqués après euthanasie des animaux. Ces protocoles ont été mis au point au laboratoire et adaptés aux études transcriptomiques, biochimiques et d'histologie. Ces protocoles ont tous été optimisés et raffinés permettant de réduire à son minimum le nombre d'animaux à utiliser. Les mesures mises en place pour réduire la douleur pendant les procédures expérimentales (anesthésie, analgésie, points limites adaptés etc...). L'injection de tamoxifène (procédure 1) n'est pas répertoriée pour causer une inflammation mais nous surveillerons les animaux pendant la semaine d'injection pour détecter tout état inflammatoire visible par une fourrure ébouriffée, présence de lésion, le dos voûté, une réduction des déplacements. Dans ce cas qui constitue le point limite de ce protocole, les animaux seraient immédiatement euthanasiés par dislocation cervicale. Dans le cas de la perfusion intracardiaque (procédure 2 sans réveil), les animaux seront profondément anesthésiés. Concernant l'élevage, Les animaux seront surveillés quotidiennement et placés dans un environnement propice à leur bien-être : nourriture et eau ad libitum; cycle jour nuit; aération et température contrôlées; favorisation des comportements sociaux en mettant les animaux à plusieurs dans des cages suffisamment grandes; environnement enrichi (coton pour la nidification). Si un animal montrait des signes tels que dos voûté, poil hérissé, présence de lésion, absence de comportement sociaux, il serait immédiatement euthanasié par dislocation cervicale. Ces signes constituent les points limites pour l'élevage. De plus, nous veillerons au bien-être des animaux, afin de détecter tout indicateur de souffrance et déterminer si besoin l'arrêt de l'expérimentation. Ainsi, les animaux seront surveillés quotidiennement et placés dans un environnement propice à leur bien-être : nourriture et eau ad libitum; cycle jour nuit; aération et température contrôlées; favorisation des comportements sociaux en mettant les animaux à plusieurs dans des cages suffisamment grandes; environnement enrichi (coton pour la nidification).

15199 La mucoviscidose est une maladie héréditaire monogénique autosomique récessive grave affectant chaque année un nouveau né sur 4200 en France. Nos travaux de recherche visent à mettre au point un traitement curatif pour cette maladie. Nous voulons ici évaluer l'efficacité de transfert de gènes *in vivo* de formulations, issues de nos recherches, et préalablement testées de façon approfondie en conditions *in vitro*. Nos investigations nous ont permis de sélectionner 20 formulations lesquelles représentent des candidates parmi les plus intéressantes à tester à l'heure actuelle.

Dans le cas présent, les molécules testées correspondent à des vecteurs synthétiques et les cellules cibles sont celles des bronches. Ceci implique d'effectuer des tests en conditions *in vivo* afin de prendre en compte toutes les contraintes liées à la complexité des voies respiratoires pulmonaires lesquelles ne peuvent être reproduites en conditions *in vitro*. La méthode d'administration utilisée consiste à délivrer les formulations à tester sous la forme d'un aérosol pouvant être respiré. Les molécules testées peuvent ainsi interagir directement avec les voies

respiratoires, en particulier avec les cellules cibles à traiter. L'espèce animale de référence pour ce type d'étude est la souris. Il s'agit de l'espèce Balb/c, elles seront âgées au minimum de 7 semaines avant l'intégration dans le protocole. Elles y respirent un aérosol formé à partir des agents de transfert de gènes à tester. L'administration par aérosol est une stratégie adaptée pour un traitement de maladie telle que la mucoviscidose; elle pourrait être rapidement transposée à la clinique, en particulier du fait que le matériel utilisé pour générer l'aérosol (le nébuliseur) est déjà utilisé par des patients pour d'autres indications. La procédure ne génère pas ou peu de stress, ce qui impacte positivement la qualité des résultats obtenus en réduisant en particulier la variabilité liée à l'administration et donc le nombre d'animaux qu'il est nécessaire d'inclure, en bon accord avec la règle des 3R. Le nombre total d'animaux nécessaires pour la réalisation de ce protocole est de 315 souris ([20 formulations à tester * 15 animaux] + 15 animaux « témoins »). Des souris pourront être placées dans des cages métaboliques afin d'obtenir des informations sur l'élimination de la formulation aérosolisée. Certains des animaux employés (20 au maximum) pourront intégrer le protocole IRM afin d'obtenir des résultats plus approfondis de la distribution de l'aérosol. Ce protocole d'expérimentation animale contient trois procédures, une de classe légère pour les aérosols multiples. Une deuxième procédure de classe modérée pour le passage en cage métabolique et enfin une classe sans-réveil pour la mise à mort des animaux. Ces trois procédures sont en adéquation avec la règle des 3R. Dans le cadre du remplacement, toutes nos expérimentations sont précédées d'une phase de test *in vitro* permettant de ne retenir que les molécules présentant les meilleures chances de succès. La réduction du nombre d'animaux est au maximum sans mettre en péril l'obtention de résultats statistiquement exploitables. Ces expérimentations sont indispensables pour optimiser nos protocoles et nous permettre de faire un lien entre les résultats obtenus *in vitro* et un éventuel développement clinique. Le raffinement sera assuré notamment par des phases d'acclimatation, un enrichissement de l'environnement, un suivi quotidien des animaux ainsi qu'une gestion de la douleur suivant une échelle stricte et des points limites bien établis.

15200 1-Objectif scientifique du projet

Les Henipavirus sont des virus zoonotiques (passant de l'animal à l'homme), qui ont émergé en Australie puis en Asie du Sud-Est pendant les années 90. Ce nouveau genre est composé de trois virus appelés respectivement Hendra (HeV), Nipah (NiV) et Cedar. Le virus Hendra est apparu le premier et cause des ravages dans les troupeaux de chevaux australiens. En 1998, en Malaisie, NiV a émergé, via les chauves-souris, chez les porcs avant de se transmettre à l'homme provoquant l'infection de 265 personnes, avec 40% de mortalité. Pour enrayer cette épidémie plus d'un million de porcs furent euthanasiés. Cette infection représente une des zoonoses virales parmi les plus dangereuses transmises par les chauves-souris, posant des problèmes médicaux et économiques sérieux. Depuis, 18 réémergences se sont succédées en Inde et au Bangladesh avec plus de 80% de mortalité humaine et une transmission interhumaine reconnue et presque systématique. Plus récemment, la découverte de l'exposition d'une forte proportion des porcs du Ghana au NiV, a attiré une attention particulière de l'OIE et l'OMS concernant le danger grandissant encouru si rien n'est entrepris pour lutter contre les zoonoses à Henipavirus. De plus, l'absence de traitement et de vaccin efficaces commercialisés ainsi que la forte mortalité qu'ils engendrent, font de ces virus un réel danger pour l'homme et de potentiels agents de bioterrorisme. L'objectif de ce projet est de contribuer à la mise en place d'une nouvelle stratégie antivirale contre les Henipavirus, en développant une approche d'administration de peptides capables d'inhiber l'infection virale. Dans le cadre de ce projet nous proposons de développer une nouvelle approche basée sur l'aérosolisation (nébulisation) des peptides, dans le but de les distribuer dans le système respiratoire, afin d'agir au niveau de l'entrée du virus. Il apportera ainsi des réponses en recherche fondamentale et en recherche appliquée.

2- Retombées attendues

Cette approche contribuera à développer une approche d'administration par nébulisation d'un peptide capable d'inhiber l'infection virale par inhibition de la fusion virale et par conséquence

l'entrée du virus dans la cellule hôte. Elle présente une stratégie conceptuellement nouvelle de protéger la population à risque contre l'infection par les virus respiratoires, incluant les Henipavirus.

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

Toutes les étapes du projet sont basées sur des études effectuées et validées auparavant par une méthode *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* chez le hamster. La poursuite des tests chez le Primate Non Humain (PNH) plus précisément le Vervet est nécessaire avant de procéder à l'essai clinique chez l'homme. La mise au point de la nébulisation sera effectuée en amont sur un autre lot de Vervets (autre établissement utilisateur (EU)). Le remplacement n'est donc plus possible à ce stade du projet. L'état de l'animal est évalué grâce à une grille de scoring et des points limites précis sont décrits. Toute atteinte de ces points limites entraînera la mise à mort immédiate de l'animal. Afin d'obtenir un suivi de température et du rythme respiratoire en continu et en temps réel, les trois animaux du groupe témoin positif subiront une chirurgie chez le fournisseur pour la pose d'un implant de télémetrie dans la cavité intrapéritonéale.

L'ensemble des gestes techniques seront réalisés sous anesthésie. Les animaux seront infectés par voie endo-trachéale (pour simuler l'infection chez l'homme) et traités une fois par jour pendant 3 jours. Il est à noter que pour des raisons de sécurité biologique, le virus est administré directement dans la trachée à l'entrée des poumons plutôt que par la nébulisation. Les animaux seront anesthésiés 3 fois par semaine pour un examen clinique avec prélèvements de sang et écouvillonnages. Les animaux qui seront malades pourront présenter des signes d'asthénie, des troubles respiratoires, voir des troubles neurologiques. L'ensemble des animaux sera mis à mort à la fin de la procédure.

4- Nombre total d'animaux inclus dans ce projet

Ce projet nécessitera l'implication de 9 Vervets répartis sur une procédure jugée sévère. Le nombre d'animaux par groupe a été réduit au minimum afin d'observer les effets attendus.

15201 Le cœur est une pompe dont le fonctionnement, oscillant en permanence entre contraction et relaxation, nécessite beaucoup d'énergie. Cette énergie est apportée par un organite appelé mitochondrie. Les mitochondries sont en quelque sorte les centrales énergétiques de la cellule, elles transforment les carburants apportés par la cellule en énergie sous forme d'ATP. Parmi ces carburants il y a le calcium qui lui est apporté par un réseau de citernes. Enfin, comme toutes les centrales énergétiques, si la mitochondrie dysfonctionne, elle produit des déchets toxiques pour la cellule qui peuvent induire une altération de la fonction cardiaque allant jusqu'à l'arrêt du cœur.

Le but de ce projet est de déterminer l'impact d'une altération dans l'apport en calcium par le réseau de citerne sur la fonction de la mitochondrie. Les répercussions de cette altération seront analysées aussi bien d'un point de vue cellulaire que fonctionnel grâce à des mesures obtenues par des électrocardiogrammes et des échographies. Pour cela nous travaillerons sur un modèle murin où la perte d'une protéine induit une fuite de calcium permanente par le réseau de citernes.

La partie expérimentale de l'étude est basée sur l'utilisation de souris adulte à différents âges (3 mois et 24 mois) (nombre estimé 120) pour tester l'effet de la fuite de calcium par les citernes au cours du vieillissement. Nous respecterons le principe des 3 R. Si une alternative est identifiée pendant la réalisation de nos travaux nous Remplacerons notre stratégie immédiatement. Nous avons organisé nos expériences aux mieux pour Réduire le nombre d'animaux nécessaires à l'acquisition des données (utilisation des mêmes souris pour plusieurs expériences, choix de la télémetrie pour acquisition de l'électrocardiogramme sur animaux vigiles, choix de l'échocardiographie pour l'étude de la fonction cardiaque). Nous avons Raffiné nos approches pour réduire au strict minimum la détresse imposée à ces animaux en appréciant au mieux les points limites (mise en place d'une grille d'évaluation des signes de douleurs), en utilisant une anesthésie et analgésie avant toute chirurgie et en post-opératoire afin d'éviter la génération de douleur et d'angoisse).

Les animaux sont stabulés par cage de 5 sur des portoirs ventilés dans une pièce de l'animalerie agréée A1, sous contrôle permanent des températures, hygrométrie et sous un cycle de lumière (12/12h). En terme d'enrichissement, des plaques de cotons de cellulose (safe square) leur

permettant de faire un nid sont ajoutés et les animaux ont des cabanes en plexiglass teinté. Les animaux ont accès à la nourriture et eau ad libitum.

15202 Dans le noyau de nos cellules, l'ADN, qui constitue nos chromosomes, est le support de notre matériel génétique grâce notamment à la présence de séquences codantes les gènes. Les gènes qui permettent l'expression et la transmission de nos caractères héréditaires ne représentent pourtant qu'une faible proportion de l'ADN. Des séquences non codantes et présentes en de multiples copies, appelées « séquences répétées », occupent une proportion considérable de nos chromosomes. Longtemps ignorées, il apparaît pourtant que ces régions de l'ADN sont importantes pour la régulation correcte de la structure de nos chromosomes ainsi que pour l'expression de nos gènes. Ainsi, il a été mis en évidence que des défauts dans la régulation des séquences répétées sont retrouvées dans des pathologies chez l'Homme tel que le cancer.

Au laboratoire, nous étudions la régulation des séquences d'ADN répétées à travers différents modèles *in vitro* (culture de cellules humaines et murines) et *in vivo* (souris). Nous cherchons à comprendre comment ces régions de l'ADN peuvent finalement être altérées dans des pathologies. Étonnamment, lors du développement embryonnaire chez la souris, les séquences répétées retrouvées aux extrémités des chromosomes, les télomères, présentent une régulation atypique qui se rapproche de ce que l'on observe dans certains cas de cancers humains (cancers de type ALT pour Alternative Lengthening of Telomeres). L'étude des télomères dans le modèle d'embryon de souris présente donc un intérêt particulier pour comprendre comment ces séquences sont régulées dans un contexte normal et pathologique.

La règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer) est respectée. Lors des expérimentations, est pris en compte l'utilisation d'un minimum d'animaux, en utilisant au mieux ses animaux (âge approprié pour une reproduction efficace, sélection des meilleurs reproducteurs) et en prenant soin d'eux (hébergement, enrichissement). Les animaux sont contrôlés quotidiennement afin de s'assurer de leur bien-être physique (poids, pelage) ou dans leur comportement (stéréotypies, agressivité entre animaux dans une même cage). Lorsque cela est possible nous utiliserons des souches hybrides et non consanguines qui produisent des embryons en plus grande quantité et de meilleure qualité afin de réduire le nombre d'animaux à utiliser. Enfin, nous sommes aussi particulièrement attentifs aux évolutions technologiques de ce domaine de recherche afin d'utiliser des outils toujours plus performants pour nous permettre d'utiliser moins d'animaux ou de substituer le modèle animal par un modèle *in vitro* si cela devient possible pour certaines approches expérimentales spécifiques.

Le nombre maximum d'animaux utilisés pendant les 5 ans sera de 1440

15203 Le nombre de médicaments à l'origine de perturbations ou d'atteintes gastro-intestinales est en croissance constante. L'apparition d'ulcères gastriques et la perturbation de la motricité intestinale comptent ainsi parmi les effets indésirables les plus fréquents. On sait par exemple depuis longtemps que la plupart des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), peuvent entraîner fréquemment des effets indésirables gastro-intestinaux allant de l'érosion de la muqueuse gastrique à la perforation et à l'hémorragie. Ces mêmes médicaments, mais aussi de nombreux antibiotiques par exemple, peuvent également être à l'origine de diarrhées. Par ailleurs, certains médicaments antidépresseurs, antihypertenseurs, anticoagulants ou antalgiques peuvent être à l'origine de l'apparition d'une constipation, pouvant devenir chronique. C'est le cas notamment des opioïdes qui entraînent presque systématiquement une constipation pouvant rapidement devenir extrêmement désagréable, voire même dangereuse. D'autres médicaments (neuroleptiques, certaines classes de molécules utilisées pour le traitement de la maladie de Parkinson, etc ...) ont également pour effet secondaire l'apparition de constipation.

Dans la mesure où ces effets secondaires ne sont pas limités à un nombre restreint de classes pharmacologiques, l'étude des effets secondaires digestifs de candidats médicaments est envisagée très tôt dans le processus de développement du médicament. Ils font l'objet de tests complémentaires décrits dans les textes réglementaires issus de la conférence internationale de l'harmonisation des exigences techniques pour l'enregistrement d'un nouveau médicament destiné à l'usage humain (ICH7A).

Dans cette optique, différents tests *in vivo* ont été développés chez le rat pour évaluer, de manière simple, les effets de candidats médicaments sur le tractus digestif. Ces tests sont réalisés chez le rat (issu de souches non consanguines). En effet, compte tenu de la complexité du système digestif, et de la possibilité d'une action directe, mais aussi indirecte sur ce système, ces évaluations nécessitent la réalisation de tests sur animal entier, qui font l'objet du présent projet. Il n'existe pas à l'heure actuelle d'alternatives à l'utilisation des animaux pour étudier l'effet d'un candidat médicament sur le tractus digestif (Remplacement).

Nos données issues d'études antérieures (moyennes et écart-types) ont permis de calculer la taille de la cohorte optimale permettant de limiter le nombre d'animaux sans diminuer pour autant la puissance de nos analyses statistiques (Réduction). Ainsi, le nombre d'animaux inclus dans ce projet a été déterminé à N = 50 par série expérimentale pour chacun des 3 tests (mesure de la motricité intestinale, mesure de la vidange gastrique et évaluation de l'activité ulcérogène). En effet, 5 groupes de N=10 rats seront réalisés un groupe contrôle négatif, un groupe contrôle positif et trois groupes recevant le (ou les) candidat(s) médicament(s) à une (ou plusieurs) dose(s). Un total de 15 séries sur 5 ans est estimé sur la base de notre activité de prestation de services des années précédentes, soit un total de 750 animaux. Les animaux seront observés quotidiennement par un personnel qualifié permettant la détection des signes de douleurs. La variation du poids de l'animal, l'apparence physique, l'examen clinique dans sa cage, l'abreuvement et l'alimentation ainsi que le comportement naturel et provoqué seront contrôlés. Les points limites ont été fixés sur la base de l'évaluation de ces critères et de notre bonne connaissance de ces modèles réalisés depuis plusieurs années. Si un des points limites était atteint, des mesures seront prises pour éviter toute sorte de souffrance et respecter le bien-être des animaux. De plus, les animaux auront accès à différents types d'enrichissements cylindres en cartons pour l'exploration et bouts de bois à ronger (Raffinement).

15204 Les overdoses mortelles par mésusage d'opioïdes analgésiques, en augmentation exponentielle depuis 10 ans, représentent désormais un problème de santé publique majeur, à l'origine d'une crise sanitaire sans précédent aux Etats-Unis et qui menace aujourd'hui la France. L'intoxication par opioïdes se manifeste par un syndrome clinique associant trouble de conscience, myosis (diminution du diamètre de la pupille) et dépression respiratoire. Les effets toxiques des opioïdes mais également d'autres effets indésirables tels que la constipation, les nausées, les vomissements, le prurit ainsi que l'induction d'une dépendance et d'une tolérance limitent l'utilisation des analgésiques opioïdes actuels, bien que ces derniers soient de plus en plus prescrits et sollicités. L'un des enjeux de la recherche est donc de trouver une molécule présentant des effets antalgiques équivalents ou supérieurs aux molécules actuelles avec moins d'effets toxiques, en particulier moins d'effets neuro-respiratoires.

Depuis l'identification et la caractérisation des peptides opioïdes endogènes, les endomorphines, un intérêt particulier s'est porté sur ces molécules ainsi que sur leurs dérivés de synthèse. Certaines études récentes portant sur les analogues des endomorphines ont ainsi montré des résultats prometteurs avec une très nette amélioration du profil pharmacologique et toxicologique d'analogues des endomorphines en comparaison avec la morphine. Cependant ces composés montrent une stabilité enzymatique très limitée qui rend difficile d'augmenter le délai entre 2 prises et ainsi de réduire la dépendance et la tolérance vis-à-vis de ces composés. Afin de pallier cette problématique, deux formulations innovantes à libération prolongée administrables par voie sous-cutanée (SC) ont été développées, l'hydrogel et le biogel.

Ainsi, l'objectif de cette étude est d'évaluer 1- les effets analgésiques et toxiques d'une administration unique de ces nouvelles formulations d'un analogue de l'endomorphine 2 et 2- d'évaluer le développement d'une tolérance des effets pharmacologiques et toxiques à long terme.

Bien que la sélection des formulations optimales ait été réalisée *in vitro* afin de ne tester que les composés les plus prometteurs vis-à-vis de leur efficacité analgésique et d'une durée d'action prolongée, les réponses analgésiques et respiratoires mettent en jeu de nombreux mécanismes dont la régulation ne peut se reproduire *in vitro* à ce jour. Par conséquent, ce projet a été élaboré afin de respecter le principe des 3R en réduisant au minimum le nombre d'animaux utilisés et en

limitant le plus possible toute souffrance et douleur aux animaux pendant l'expérimentation, à l'aide de la mise en place de points limites adaptés et suffisamment précoces. Enfin, ce projet sera mené chez la souris en raison de la littérature déjà existante sur le sujet et sur les méthodes utilisées pour ce projet.

Ce projet d'une durée de 5 ans nécessitera 956 souris mâles Swiss.

Différentes procédures seront réalisées chez la souris après administration des différentes formulations opioïdes afin de caractériser les effets analgésiques suite à l'exposition de celles-ci un stimulus thermique douloureux, ainsi que les éventuels effets secondaires légers tels que la sédation par la mesure de leur activité locomotrice, ou plus graves comme des atteintes respiratoires par la méthode de la pléthysmographie corps-entier. Enfin des prélèvements sanguins et cérébraux seront réalisés à différents temps pour étudier la pharmacocinétique du peptide opioïde seul, ou après administration des 2 formulations testées (hydrogel et biogel).

Cette étude nous permettra ainsi de sélectionner parmi de nouvelles formulations innovantes, celles présentant un meilleur ratio bénéfice/risque et d'envisager des études chez l'Homme dans l'espoir de proposer de nouvelles thérapeutiques mieux tolérées dans la prise en charge de la douleur.

15205 Le but de ce projet est d'évaluer la pathogénicité d'agents infectieux (bactéries, virus ou parasites) et la protection induite par des candidats vaccins ou des anticorps chez le primate non humain.

Comme préconisé par les autorités de santé, l'évaluation de la protection induite par de nouveaux candidats vaccins ou des anticorps doit être effectuée *in vivo* dans des modèles animaux naïfs ou pré-infectés, en particulier lorsque les corrélats de protection ne sont pas complètement identifiés. Le recours aux modèles primates non-humains peut s'avérer nécessaire par rapport aux modèles de type rongeur lorsque le pathogène et le candidat vaccin ou anticorps testés présentent une spécificité d'espèce proche de l'homme.

Les espèces utilisées pour ce projet sont des singes cynomolgus (*Macaca fascicularis*) et singes rhésus (*Macaca mulatta*). Le modèle animal utilisé est sélectionné en fonction de la maladie infectieuse ciblée, du type de réponse immune analysée et des données de la littérature ou des connaissances scientifiques.

La réponse immune induite post-infection est également évaluée.

Si des animaux présentent une dégradation de l'état général, des lésions ou des symptômes nécessitant l'euthanasie, celle-ci sera effectuée selon les méthodes réglementaires recommandées. Le degré de sévérité est considéré comme modéré.

L'ensemble de ce projet peut nécessiter l'utilisation de 350 primates non-humains sur une période de 5 ans (basée sur une évaluation des besoins actuels).

Mise en œuvre des 3R

Remplacement : A ce jour, il n'existe pas de méthodes alternatives *in vitro* pour évaluer les capacités d'un candidat vaccin ou d'un anticorps à induire une protection contre une infection à un pathogène ou pour évaluer les réponses immunitaires post-infection. Le recours à l'animal de laboratoire s'avère donc nécessaire.

Réduction : Chaque étude est revue par les biostatisticiens afin de définir le nombre minimum et suffisant d'animaux requis permettant une analyse statistique des résultats.

Raffinement : Les animaux sont hébergés en groupe dans des grandes cages (volières) contenant des dispositifs d'enrichissement dans des locaux appropriés, conformes aux standards réglementaires. Ils sont suivis par un personnel spécifiquement formé à ces espèces.

En fonction des pathogènes, une grille d'évaluation des signes cliniques post-infection spécifique de chaque pathogène pourra être mise en place entre le responsable d'étude, les biostatisticiens et les vétérinaires cliniciens afin de raffiner les modèles expérimentaux.

En cas de signes cliniques, et dans les meilleurs délais, les animaux bénéficieront des soins vétérinaires nécessaires, ou seront euthanasiés selon les méthodes recommandées.

15206 La production de populations uniquement de sexe femelle ou de sexe mâle est une pratique qui permet d'augmenter la compétitivité des exploitations piscicoles en exploitant des dimorphismes sexuels de croissance ou de qualité de chair des mâles ou des femelles selon les espèces. Cependant, la production de ces populations monosexes nécessite des traitements hormonaux des géniteurs. Les molécules de synthèse utilisées pour le traitement hormonal présentent un risque pour la santé des personnels des piscicultures et la qualité de l'environnement. Le projet présenté se propose de développer une nouvelle biotechnologie qui permettra de continuer à produire des populations monosexes mâles ou femelles sans hormone chez les salmonidés. Cette biotechnologie nécessite la greffe de cellules souches germinales (CGS) chez un animal receveur rendu préalablement stérile par la triploïdisation de ses propres cellules souches germinales. Le nombre d'animaux greffés au cours du projet et concernés par la réglementation en vigueur sur l'éthique en expérimentation animale sera de 5400. La greffe est réalisée en suivant 5 procédures successives : la préparation des embryons triploïdes à greffer, la préparation des cellules germinales souches, la greffe de ces cellules, le marquage individuel des animaux avec une puce électronique, et enfin la récupération des gamètes produits par les animaux greffés.

Le projet prend en compte la règle éthique des 3Rs - Remplacer Il n'existe pas d'alternative *in vitro* à la collecte de cellules germinales souches à partir des gonades d'animaux donneurs malgré les recherches actuelles visant à générer ces cellules souches à partir de cellules souches embryonnaires ou de cellules somatiques adultes (peau). D'autre part, il n'est toujours pas possible de produire des spermatozoïdes *in vitro* et encore moins des ovocytes. - Réduction Le nombre d'animaux transplantés et élevé au-delà de la première prise alimentaire est adapté au plus juste pour permettre d'évaluer le taux de succès de la transplantation et les performances de reproduction des animaux transplantés avec succès. Noter que dans ce projet, nous cherchons à évaluer si il existe un avantage à extraire des cellules souches germinales issues de femelles ovulées pour remplacer l'utilisation de femelles immatures qui possèdent des ovaires de plus petites tailles et donc moins riches en cellules souches germinales. Nous espérons pouvoir ainsi diminuer le nombre de femelles à euthanasier pour collecter les cellules souches germinales. - Raffiner Le protocole expérimental préconise l'anesthésie des animaux pour limiter le stress des animaux manipulés et la douleur éventuellement induite par la piqûre d'injection des cellules souches germinales. D'autre part, nous procéderons rapidement à une euthanasie prématurée en cas de malformations ou de comportements anormaux des animaux transplantés traduisant un mal être.

15207 Les maladies nutritionnelles hépatiques regroupent la maladie alcoolique du foie et ce que l'on appelle communément la maladie du soda, cette dernière étant associée à un surpoids ou une obésité. Cependant tous les patients ayant une consommation excessive d'alcool ou étant obèses ne développent pas des complications hépatiques. Les bactéries intestinales ont été identifiées comme un facteur participant à la susceptibilité individuelle. De plus, il a été démontré que les bactéries intestinales des patients ne développant pas de lésions hépatiques s'avèrent protectrices et même curatives. Il y a donc un intérêt à identifier les bactéries permettant cet effet protecteur et curateur pour développer de nouveaux traitements basés sur la modulation du microbiote intestinal. A partir d'un microbiote intestinal de patients protégés du développement des atteintes hépatiques, des bactéries ont été isolées par culture. Différents tests bactériens *in vitro* ont permis d'identifier une centaine de bactéries. Sur ces 100 bactéries, 7 bactéries ont été sélectionnées pour leurs effets bénéfiques dans des modèles *in vitro* de cellules eucaryotes. Ces effets montrent que 2 souches ont des effets majeurs. Parmi les 5 autres souches ayant des effets moindres, les effets s'avèrent agir sur des fonctions non contrôlées par les 2 souches ayant les effets majeurs et pouvant donc s'avérer complémentaires.

Le microbiote intestinal agit chez les individus dans un premier temps au niveau intestinal, puis son action à distance s'observe sur les organes périphériques, en l'occurrence le foie. Afin de valider que les souches isolées ayant un effet *in vitro* sur les cellules intestinales sont bien capable de transmettre leur effet bénéfique jusqu'au foie, il est nécessaire à ce stade de tester les 2 souches seules et en combinaison pour valider leur potentiel thérapeutique dans des modèles animaux (Remplacement).

Le rongeur, ici la souris, partage bon nombre de processus cellulaires avec l'Homme et un modèle d'alcoolisation et de maladie du soda permet de reproduire les premières étapes de la maladie humaine.

Nous tenons compte de la règle des 3R (Réduction, Raffinement et Remplacement) au cours de nos différentes procédures. Nous avons défini des points limites qui permettent d'évaluer l'arrêt du protocole pour l'animal en souffrance en particulier concernant le taux d'alcoolisation. Pour chaque procédure et durant toute la période d'hébergement, nous veillons au bien-être animal. Cependant, l'enrichissement classiquement utilisé étant en cellulose et ayant un impact sur le microbiote intestinal, nous utilisons des enrichissements en plastique dur et la quantité de sciure dans la cage est augmentée afin de permettre aux animaux un enfouissement suffisant (Raffinement). Au total ce projet nécessite l'utilisation de 360 souris, nombre d'animaux qui est réduit au minimum, mais suffisant pour pouvoir faire des comparaisons et des statistiques exploitables (réduction).

15208 L'ototoxicité se manifeste par des atteintes des fonctions auditives et vestibulaires. Les troubles auditifs conduisent à l'apparition d'acouphènes, les troubles vestibulaires à des vertiges, déséquilibres et vomissements. Cette toxicité pour l'oreille est observée pour plus d'une centaine de médicaments dont des anticancéreux ou des antibiotiques. Les mécanismes physiopathologiques restent mal connus il s'agit d'une perte des cellules sensorielles au niveau de la cochlée et des ampoules canaliculaires et macules otolithiques. Différents types de mécanismes cellulaires sont observés. Le but de ce projet est de mieux comprendre les mécanismes ototoxiques et la récupération fonctionnelle suite à l'exposition à une molécule, le 3.3'iododipropionitrile (IDPN) et de corréliser les troubles oculomoteurs et posturaux aux effets toxiques spécifiques sur les différents organes vestibulaires et sur les différents types de cellules ciliées présentes au niveau des organes de l'oreille interne. L'IDPN constitue un modèle validé d'ototoxicité vestibulaire à l'origine d'un mécanisme cellulaire, l'extrusion cellulaire, mal connu.

Au total 180 souris seront incluses dans ce protocole.

Deux modèles d'ototoxicité seront évalués le premier consiste en une exposition unique à l'IDPN à différentes doses. Le second consiste en une exposition chronique dans l'eau de boisson à faible dose.

Les procédures expérimentales du projet consistent en une chirurgie courte et peu invasive pour équiper les souris d'une casquette qui permettra de mesurer leurs réflexes vestibulaires. Les souris exposées de manière unique à la substance recevront une injection et leurs réflexes testés 2 et 3 semaines plus tard celles exposées de manière chronique le seront via l'eau de boisson pendant 6 semaines, et leurs réflexes vestibulaires testés toutes les 2 semaines pendant 12 semaines. En fin de protocole les organes vestibulaires seront fixés et prélevés pour réaliser une étude histologique et analyser la toxicité au niveau cellulaire.

Le projet respecte la règle des 3R pour réduire le nombre d'animaux utilisés, une évaluation statistique sera effectuée à mi-parcours une fois le nombre théorique d'animaux nécessaires par groupe atteint cette évaluation basée sur les données expérimentales permettra de décider de la pertinence de la poursuite de l'étude. Raffinement chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité, par du personnel qualifié, pendant les tests comportementaux mais aussi en dehors de ceux-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. La douleur est rigoureusement contrôlée. La chirurgie se déroulera sous anesthésie générale avec des antalgiques en pré et post-opératoire. Remplacement : Il s'agit d'un projet de neurophysiologie intégrative qui ne peut être conduit que sur animal entier.

Des points limites évalués ont été établis en amont et gérés grâce aux moyens pharmacologiques appropriés. Par ailleurs, les animaux sont hébergés en groupes dans un environnement enrichi (copeaux, matériel de nidification). Enfin, l'eau et la nourriture sont mises à disposition "ad libitum".

Au final, ce projet de recherche permettra de mieux comprendre le phénomène d'ototoxicité en permettant une meilleure connaissance de la susceptibilité des différentes cellules ciliées et des organes vestibulaires à l'exposition de substances toxiques. Ces données permettront de mieux

prendre en charge les patients exposés à des médicaments anticancéreux ou à des antibiotiques toxiques pour l'oreille interne.

15209 Un ensemble de processus de dégradation conduit à la transformation post-mortem du muscle en viande. Ces processus ont une grande importance pour les qualités sensorielles de la viande, notamment la tendreté. Les conditions environnementales et certaines pratiques telles que le transport en groupe, ou les modifications de l'apport alimentaire des animaux sont sources de stress. Ce stress pourrait en retour modifier la conversion du muscle en viande et in fine la qualité nutritionnelle de la viande. Dans ce projet, nous nous proposons donc de suivre la cinétique des événements de transformation du muscle en viande dans le cadre d'une étude pilote de la maturation post-mortem du muscle issu de souris contrôles, et de souris génétiquement modifiées qui reproduisent le phénotype d'hypermuscularité et de composition corporelle observée chez les animaux de rente de race culard. Cette étude pilote est réalisée chez la souris ce qui nous permettra d'analyser ces événements de façon plus précise, aisée et moins coûteuse qu'une étude sur les animaux de rente.

Pour ce projet, nous utiliserons 96 animaux contrôle sauvages et 96 animaux génétiquement modifiés répartis dans 2 procédures expérimentales.

Les dispositions prises pour l'application de la règle des 3R seront les suivantes

- « Réduire » le nombre d'animaux en expérimentation

Pour nos expérimentations, nous avons prévu le nombre nécessaire d'animaux pour garder une puissance statistique suffisante dans le traitement de nos résultats. Pour réduire le nombre de souris nécessaire, chaque animal sera utilisé pour deux points de cinétique de maturation post-mortem.

- « Raffiner » la méthodologie utilisée, ce qui implique la notion de points limites (critères d'interruption, ou "endpoints")

Nous porterons une attention particulière au bien-être de nos animaux. Le suivi horaire des animaux permettra d'identifier des signes de souffrance caractérisés par l'état du pelage, le comportement de la souris (agressivité / apathie), cris, mobilité, alimentation...

Dans le cas où un animal présenterait des signes manifestes de souffrance ou perte de poids excessive ($\geq 15\%$ du poids initial), il sera sorti des procédures expérimentales et euthanasié si les signes persistent dans les 24h. Lors de la mise à jeun nous ajouterons des bâtonnets de peuplier pour que les animaux puissent continuer à ronger.

- « Remplacer » les modèles animaux

Il n'existe pas de modèle cellulaire reproduisant nos procédures expérimentales.

15210 Les glaucomes, deuxième cause de cécité mondiale, regroupent un ensemble de maladies neurodégénératives de la rétine caractérisées par la mort d'un type de neurone les cellules ganglionnaires. Ils conduisent à une perte progressive de la vision et aucun traitement curatif n'existe à ce jour. Des travaux indiquent que plusieurs maladies neurodégénératives, telles qu'Alzheimer ou Huntington, seraient associées à des altérations du métabolisme du cholestérol dans le cerveau. Ces perturbations concerneraient notamment l'enzyme CYP46A1 qui élimine le cholestérol des tissus nerveux. Quelques études suggèrent que CYP46A1 pourrait également être impliquée dans les glaucomes. Dans un modèle expérimental de glaucome chez le rat, des travaux de notre équipe ont d'ailleurs montré que le métabolisme du cholestérol est largement perturbé. Le projet présenté ici vise à définir le rôle de CYP46A1 dans la survie des cellules ganglionnaires de la rétine, notamment au cours du glaucome. La stratégie choisie consiste à inhiber l'expression de CYP46A1 dans ces cellules, puis à évaluer l'impact sur leur mort, en contexte physiologique ou au cours d'un modèle expérimental de glaucome chez le rat. La rétine étant composée de l'association de nombreux types cellulaires interagissant de façon coordonnée, seul un modèle animal peut permettre de répondre à cet objectif. Le rat est une espèce adaptée aux recherches en ophtalmologie. Sa rétine se compose des mêmes populations cellulaires que la rétine humaine et

son œil est d'un abord facile permettant d'apporter des composés à la rétine par injection intravitréenne.

Le projet comprend deux phases en contexte physiologique (416 animaux) et dans le cadre d'un glaucome expérimental (480 animaux). Le nombre total d'animaux nécessaires s'élève à 896. Plusieurs éléments sont mis en place pour répondre au principe de réduction tout en évitant de compromettre l'obtention de résultats statistiquement significatifs i) l'utilisation d'un test non paramétrique pour le traitement des données limitant le nombre de réplicas nécessaires, ii) la prise en compte des résultats obtenus antérieurement et de la variabilité couramment observée dans l'équipe sur des modèles ou techniques similaires permettant de définir le nombre d'yeux nécessaires (8 ou 10) en fonction des analyses, iii) l'utilisation des résultats de la 1ère phase pour optimiser le « timing » de la 2ème phase.

Tous les animaux seront suivis par un personnel compétent dans le respect de la charte nationale sur l'éthique de l'expérimentation animale observation quotidienne des conditions d'hébergement, examen hebdomadaire de l'état clinique de chaque animal et suivi spécifique déterminé par les procédures expérimentales (anesthésie et interventions au niveau des yeux). Les animaux seront manipulés afin de réduire au maximum douleur et détresse. Au quotidien, leur environnement sera amélioré par de l'enrichissement (tunnel, bâton à ronger). La souffrance liée aux procédures expérimentales sera évitée par l'utilisation d'anesthésiques et d'analgésiques adéquats. De plus, toute intervention sera limitée à un seul œil par animal dans le respect des directives d'utilisation des animaux dans la recherche en vision et ophtalmologie. La Structure chargée du Bien-Etre Animal (SBEA) du laboratoire assistera les expérimentateurs dans ces démarches.

15211 Les pathologies cardiovasculaires sont la cause majeure de décès en Europe. Par ailleurs, les coûts sociétaux et de prise en charge sont en constante augmentation. Pour bon nombre de pathologies cardiovasculaires, un suivi régulier et continu de paramètres telles que la régularité de la fréquence cardiaque ou la forme des ondes de l'électrocardiogramme et même une détection d'anomalies précoces de la fonction cardio-respiratoire permettraient d'éviter des conséquences morbides et même la mort subite dans les cas les plus extrêmes. Le projet a pour vocation de développer un capteur autonome de signaux biologiques de nouvelle génération permettant d'effectuer un suivi monitoré multiparamètre d'individus, à coût réduit et facile à mettre en place. Le principe repose sur le développement et l'intégration d'une part de capteurs réalisés en nanomatériaux 1D/2D pour mesurer l'électrocardiogramme, des paramètres respiratoires et biochimiques, de générateurs d'énergie thermoélectrique et de batteries imprimées, - d'autre part de l'électronique embarquée pour stocker et transférer les données sans fil vers un système de monitoring et d'analyse des signaux vitaux. Pour montrer la faisabilité technique et la reproductibilité des nouveaux capteurs, des essais de calibration et de mesures de paramètres cardiaques (capteurs électrique et mécanique) et respiratoires (capteurs mécaniques) doivent être conduits et les mesures comparées aux valeurs obtenues par des méthodes déjà éprouvées et validées. Ces essais seront conduits chez le rat (96 animaux) dans un établissement utilisateur agréé, par du personnel qualifié et compétent en expérimentation animale. Le bien-être animal et le respect des 3R sera une préoccupation majeure dans ce protocole depuis l'accueil des animaux, leurs hébergement et manipulation. En terme d'expériences, des mesures d'électrocardiogramme par holter ou par électrode de surface seront effectuées et serviront de référence aux valeurs obtenues avec les nouveaux capteurs. La mesure de la fréquence respiratoire sera effectuée par pléthysmographie et servira de référence aux valeurs obtenues par les nouveaux senseurs mécaniques. En parallèle, des mesures sur organes isolés permettront de calibrer les senseurs en vue de leur optimisation. Une fois les capteurs validés indépendamment les uns des autres, le nouveau système sera testé en entier depuis la mesure jusqu'au transfert des données. N'existant pas de méthode substitutive qui puisse éviter de recourir à l'usage d'animaux, cette étude sera réalisée en accord avec le principe des 3R avec notamment le but de réduire le nombre d'animaux (utilisation d'un même animal pour plusieurs mesures), en utilisant des systèmes de mesure non- ou faiblement invasifs et en prenant grand soins des conditions d'hébergement des animaux depuis le respect des tailles réglementaires des cages, des conditions de température et hygrométrie ainsi que la mise en place

d'enrichissement et de visites. La mise en place du dispositif de mesure de l'électrocardiogramme sera réalisée sous anesthésie générale gazeuse (Aerane, isoflurane 2.5% dans O₂). Une grille d'évaluation quotidienne des signes cliniques permettra le suivi des animaux et les actions à mener (points limites selon grille en annexe) tout au long du protocole.

15212 La tuberculose (TB), causée par l'inhalation de la bactérie *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), est l'une des dix premières causes de mortalité dans le monde et représente aujourd'hui une crise de santé publique majeure (données de l'OMS). L'utilisation de médicaments antituberculeux depuis des décennies a entraîné l'apparition de souches résistantes aux antibiotiques, limitant ainsi fortement la guérison des patients. De ce fait, parmi les axes principaux de recherche ayant pour objectif de lutter contre la TB, figurent la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques, chez l'hôte ou la bactérie. Notre équipe contribue à l'identification de nouvelles cibles par l'étude des mécanismes d'interaction entre le pathogène et le système immunitaire de l'hôte, ce qui implique l'utilisation de modèles cellulaires et animaux d'infection par Mtb. Grâce à ces modèles, nos travaux ont permis d'identifier des cibles d'actions potentielles sur la bactérie ou l'hôte. Plus particulièrement, nos travaux précédents chez la souris ont permis de mettre en évidence un rôle primordial du récepteur cellulaire appelée DCIR dans le contrôle de l'infection par Mtb et dans le maintien de l'homéostasie immunitaire. DCIR est retrouvé à la surface de nombreuses cellules immunitaires mais il est majoritairement exprimé par les macrophages et cellules dendritiques (DCs). Les macrophages et DCs jouent un rôle central dans la réponse immunitaire innée et dans la mise en place de la réponse immunitaire adaptative. Ainsi, au-delà de la TB, DCIR est décrit comme un régulateur clé de la réponse immunitaire dans de nombreux contextes pathologiques, d'origine infectieuse (e.g. paludisme) ou non (e.g. maladies auto-immunes). Cependant, les mécanismes cellulaires et moléculaires régulés par DCIR demeurent encore méconnus, notamment parce qu'en dépit de nombreux efforts le ou les ligands de DCIR n'ont pas pu être identifiés. Récemment, nos expériences *in vitro* ont permis d'identifier le ligand du DCIR humain à la surface des macrophages. De plus, nous avons prouvé que le mDCIR1 murin reconnaît le même ligand que le DCIR humain, démontrant la validité du modèle murin pour nos travaux. L'identification du ligand de DCIR ouvre de nouvelles perspectives quant à la compréhension de l'impact de cette lectine sur la réponse immunitaire *in vivo*. Dans ce projet, nous souhaitons i/mieux caractériser les fonctions régulatrices de mDCIR1 sur la réponse immunitaire et sur le contrôle de l'inflammation et ii/démontrer le rôle joué par le ligand de DCIR dans ces processus. Ces études *in vivo* seront réalisées dans plusieurs modèles d'infection (e.g. TB, *Pseudomonas aeruginosa*) ou d'inflammation (e.g. asthme) pulmonaires. Dans l'ensemble de ces études, les animaux seront utilisés pour déterminer des paramètres de sensibilité à l'infection/l'inflammation et des paramètres immunologiques (cellules immunitaires, production de cytokines/chimiokines). Le nombre maximal d'animaux utilisé sera de 10260 souris.

Afin de s'inscrire dans la logique des 3R, nous avons intégré trois étapes dans notre raisonnement. Tout d'abord, les expériences que nous souhaitons réaliser font suite à des étapes de validation dans des modèles cellulaires les expériences proposées seront réalisées au stade où les méthodes de remplacement de l'expérimentation animale ont été exploitées et où les résultats obtenus s'avèrent suffisamment prometteurs pour utiliser le modèle intégré murin. Certaines étapes de notre projet (clairement identifiées dans les procédures détaillées) pourront être suivies de décisions de poursuite ou d'arrêt de l'étude en fonction des promesses offertes par les résultats. De plus, nous avons développé des approches expérimentales permettant d'analyser, sur un même lot d'animaux, des paramètres qui étaient mesurés autrefois sur des lots d'animaux séparés. Par exemple, la préparation d'ARN, d'échantillons pour la cytométrie en flux et la mesure des charges bactériennes peuvent maintenant être réalisées sur le même échantillon. Finalement, l'expérience des années précédentes nous a fourni des indications sur la taille des lots d'animaux à respecter pour obtenir en première intention des résultats statistiquement significatifs. La douleur, la souffrance et l'angoisse animales seront présentes à plusieurs niveaux dans nos expériences. Celles-ci feront bien évidemment l'objet d'une prise en charge spécifique, indiquée dans les procédures et déjà appliquées dans nos projets précédents.

15213 L'acidémie méthylmalonique (MMAuria), est une maladie d'origine génétique causée par la déficience d'une enzyme, la méthylmalonyl-CoA mutase (MUT), qui induit un développement anormal et des crises métaboliques pouvant mener au coma voire à la mort péri-natale chez l'Homme. Les survivants présentent tout de même un risque de décompensation métabolique et des complications à long terme sévères, notamment des insuffisances rénales et des désordres neurologiques. Outre les traitements symptomatiques, il existe quelques approches thérapeutiques incluant une réduction de la consommation de protéine et une supplémentation en carnitine afin de limiter la formation de métabolites toxiques. Cependant, bien que ces approches améliorent partiellement le contrôle métabolique chez certains patients, la plupart souffrent tout de même de complications à long terme. Il existe ainsi un vrai besoin de développer des thérapeutiques spécifiques de la MMAuria.

L'étude décrite dans le présent dossier sera réalisée dans le cadre du développement deux composés en développement, destinés à l'amélioration de l'acidémie méthylmalonique et de ses complications associées. L'objectif de la présente étude sera d'évaluer l'impact de ces composés (administration journalière pendant 29 jours) sur la prise alimentaire (mesurée deux fois par semaine), le poids corporel (mesuré deux fois par semaines), la composition corporelle (mesurée 5 fois par RMN), les dépenses énergétiques à l'effort (mesurées deux fois par calorimétrie lors de tests sur tapis roulant), et la force musculaire (mesurée 4 fois par grip test) chez un modèle génétique murin de MMAuria (souris Mut ko/ki). Ce modèle présente des similarités avec la pathologie humaine. Les souris Mut ko/ki sont indiscernables de leurs contrôles jusqu'à l'âge de 100 (femelles) ou 150 (mâles) jours, âge à partir duquel les souris commencent à présenter un retard de développement aboutissant à 30% de réduction du poids corporel à 1 an sans modification de leur prise alimentaire (suggérant une augmentation des dépenses énergétiques) et une faiblesse musculaire. Elles se caractérisent également par une augmentation des taux urinaires de MMA du fait de la réduction de l'activité de la MUT. Avant 1 an, et malgré les défauts précités, le phénotype des souris n'est pas dommageable.

La présente étude nécessitera l'emploi de 80 souris (16 souris wild type et 64 souris Mut ko/ki sous fond génétique C57Bl/6) réparties en 10 groupes expérimentaux composés de 8 animaux.

La règle des 3Rs a été prise en compte dans l'élaboration du présent protocole

- Raffinement : Le protocole a été planifié de façon à limiter au maximum tout stress et tout inconfort pour les animaux. Notamment, les souris seront utilisées à l'âge de 22 semaines au début du protocole et seront âgées de 28 semaines à l'issue du protocole, permettant de s'affranchir des événements tardifs de la pathologie et ainsi de ne pas laisser le phénotype devenir dommageable pour l'animal. Pour des raisons techniques (mesures de dépenses énergétiques et de prise alimentaire), les animaux seront hébergés en cages ventilées individuelles mais un enrichissement du milieu sera assuré par l'ajout d'igloos et de matériels de nidification. Enfin, un suivi journalier des animaux à l'aide d'une grille de score permettra une action rapide en cas d'atteinte des points limites établis.

- Réduction : Le nombre d'animaux utilisés a été rationalisé à partir des données de la littérature, de façon à être en mesure de mettre en évidence une différence statistiquement significative sur les paramètres étudiés.

- Remplacement : L'utilisation d'animaux à des fins scientifiques se justifie ici car il n'existe aucune méthode de substitution n'utilisant pas l'animal de laboratoire et permettant l'étude de l'impact d'un composé sur la MMAuria. Le modèle animal qui sera utilisé est un modèle caractérisé dans la littérature et dont le phénotype a été décrit. Ce modèle s'avère d'intérêt majeur dans le cadre d'études précliniques cherchant à mettre en évidence les effets bénéfiques de composés sur la MMAuria.

15214 La maladie de Parkinson (MP) est, du fait de sa prévalence de 1,5 pour mille, la plus fréquente des pathologies neurodégénératives, après la maladie d'Alzheimer. Elle touche environ 160 000 personnes en France. La MP se caractérise par un syndrome moteur défini par une akinésie (défaut

d'initiation et d'exécution des mouvements volontaires) associée à un tremblement de repos, une rigidité musculaire et une instabilité posturale.

La caractéristique neuropathologique de la MP est la dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques de la Substance Noire compacte (SNc). Les événements qui sous-tendent cette dégénérescence restent mal connus. Ceci rend le diagnostic de la MP difficile, d'autant que l'apparition des symptômes ne se produit qu'après une perte neuronale importante. À l'heure actuelle, la stratégie thérapeutique de référence vise à compenser le déficit dopaminergique par l'administration du précurseur de la dopamine, la L-DOPA et 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 (mouvements anormaux involontaires ou dyskinésies). Compte tenu de ces complications, une stratégie alternative non médicamenteuse, la stimulation cérébrale profonde, est utilisée depuis une quinzaine d'années. Cependant, cette thérapie chirurgicale n'est pas accessible à tous les patients et son caractère très invasif (chirurgie intra-cérébrale) incite actuellement de nombreux laboratoires à développer d'autres stratégies médicamenteuses qui visent soit à associer la L-DOPA avec d'autres composés afin d'en diminuer la dose, soit à retarder ou supprimer sa prise. Dans ce contexte, il est donc aujourd'hui crucial de trouver de nouveaux candidats médicaments et de pouvoir tester leur efficacité sur des modèles précliniques prédictifs.

Ainsi, le but de ce projet est de pouvoir proposer 3 modèles précliniques de la MP chez le rat dans le but de tester l'efficacité antiparkinsonienne d'un candidat médicament. Le premier modèle est un modèle utilisé en première intention car il produit un blocage pharmacologique dopaminergique transitoire et non une dégénérescence irréversible des neurones dopaminergiques comme observé dans la MP et mime le trouble de l'initiation motrice rencontré chez le patient parkinsonien (akinésie). Les deuxièmes et troisièmes modèles proposés sont des modèles de lésion unilatérale dopaminergique totale obtenue grâce à l'injection intracérébrale directement dans la SNc de composés entraînant la mort sélective des neurones dopaminergiques de cette structure. Ces modèles expérimentaux, analogue de la MP, miment les déficits moteurs (notamment l'akinésie) observés chez les patients parkinsoniens à des stades avancés de la maladie. Plusieurs semaines après la lésion, des tests comportementaux 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. Si le traitement est administré avant la lésion, le potentiel effet neuroprotecteur pourra être également évalué en comptant le nombre de neurones dopaminergiques survivant après lésion dans les différents groupes expérimentaux. Ainsi les modèles de lésion dopaminergique intra-cérébrale apparaissent comme des modèles plus élaborés, mimant la dégénérescence des neurones dopaminergiques observée dans la MP où l'efficacité des candidats médicaments peut être évaluée plus finement à la fois sur les symptômes moteurs parkinsoniens mais également sur l'aspect de neuroprotection. Ces 3 modèles sont donc complémentaires.

"Raffinement" avant toute expérimentation, les animaux font l'objet d'un programme de socialisation visant à diminuer le stress lié à la manipulation. Les rats sont manipulés pendant quelques minutes par les expérimentateurs qui effectueront les tests comportementaux 1 à 2 fois par jour pendant la phase d'acclimatation pour habituer l'animal. Lors de la chirurgie, l'injection des toxines se réalise sous anesthésie chimique ou gazeuse, avec un contrôle de la température corporelle et une couverture analgésique adaptée pour éviter toute souffrance. En fin de chirurgie, les animaux sont placés dans une chambre chauffée jusqu'à leur réveil complet. De plus, un personnel qualifié évaluera cliniquement les animaux tous les jours et un certain nombre de mesures a été mis en place afin de minimiser toute souffrance et respecter le bien-être des animaux. Si le point limite est atteint au cours du protocole, l'animal concerné sera évalué cliniquement par au moins deux personnes qualifiées et sera mis à mort sans souffrance selon les normes éthiques en vigueur.

"Réduction" nos données préalables réalisées avec le traitement de référence actuellement en clinique (L-DOPA) nous ont permis un calcul de la taille des cohortes d'animaux nécessaires aux tests d'efficacité d'une molécule candidate, permettant ainsi de limiter le nombre d'animaux utilisés sans pour autant diminuer la puissance de nos analyses. Pour tester l'efficacité d'un candidat

médicament sur une série expérimentale, composée d'un groupe placebo, un groupe contrôle négatif, un groupe contrôle positif traité avec un composé de référence et de 3 groupes tests (1 composé candidat testé à 3 doses), 60 animaux seront utilisés (10 par groupe). Nous estimons à 25 le nombre de séries sur 5 ans, soit un total de 1500 animaux.

"Remplacement" malgré qu'il existe des modèles de cultures cellulaires *in vitro* de neurones dopaminergiques, l'étude des symptômes moteurs et l'efficacité de candidats médicaments sur la restauration comportementale nécessite l'utilisation de l'animal entier car cela ne peut être étudié que dans un organisme vivant

15215 Chez l'animal comme chez l'Homme, l'exposition périnatale (c'est-à-dire lors de la gestation ou juste après la naissance) à des conditions stressantes peut créer une vulnérabilité à long terme et favoriser l'émergence de troubles du comportement. Chez l'Homme, des perturbations relationnelles entre la mère et son enfant lors des premiers jours de vie de ce dernier augmentent le risque de survenue de troubles mentaux tels que psychoses, anxiété, stress chronique, conduites addictives ou dépression. Une séparation maternelle constitue un stress précoce pendant une période du développement cérébral intense, et est donc susceptible d'engendrer un déficit du fonctionnement cérébral de façon durable. Le modèle de séparation maternelle est ainsi utile en recherche pour décrire les conséquences d'une telle séparation au point de vue comportemental et neurobiologique et pour tester des composés pharmacologiques susceptibles d'avoir un effet bénéfique sur les conséquences néfastes de ce stress précoce sur le développement du petit. Les modèles *in vitro* alternatifs ne permettent pas de modéliser une séparation maternelle, c'est pourquoi il est nécessaire d'utiliser un modèle animal pour la réalisation de ce projet. Il existe plusieurs modèles de séparation mère/nouveau-né chez le rongeur (rat ou souris). Ils diffèrent par la durée des épisodes de séparation (15 minutes à 24 heures), la répétition des séparations (de 1 jour à 3 semaines), l'âge (du second au 21^{ème} jour de vie) ou le sexe des petits. L'étude sera réalisée avec le nombre minimal d'animaux nécessaire dans chaque groupe d'études. La mise en place d'un tel modèle nécessitera l'utilisation de différentes espèces (rats ou souris), différentes souches, et différentes conditions expérimentales. Elle nécessitera donc $n = 2$ (souches de souris) $\times 24$ ($n = 12$ témoins et 12 séparés) $\times 8$ conditions = 384 souris utilisées au maximum pour la mise au point du modèle et $n = 2$ (souches de rats) $\times 24$ ($n = 12$ témoins et 12 séparés) $\times 8$ conditions = 384 rats utilisés au maximum pour la mise au point du modèle. Un fois le modèle établi au laboratoire, nous évaluerons les effets de différents composés pharmacologiques sur ce modèle des molécules de références anxiolytiques et/ou antidépressives et des molécules d'intérêt développées par notre laboratoire. Les troubles comportementaux des animaux seront évalués dans 3 à 5 tests classiques préalablement approuvés par le comité d'éthique. Afin de limiter le nombre d'animaux utilisés, ceux-ci passeront dans différents tests comportementaux. Cette seconde phase du projet nécessitera donc $n = 48$ ($n = 12$ témoins/véhicules, $n = 12$ témoins/molécule, $n = 12$ séparés/véhicule, $n = 12$ séparés/molécule) $\times 4$ (2 molécules de références et 2 molécules développées par notre laboratoire) $\times 3$ (doses) = 576 animaux maximum pour la durée de l'étude. Le comportement de ces animaux sera évalué dans différents tests permettant d'observer l'anxiété et/ou certains troubles dépressifs. Le comportement des animaux pourra être évalué dans un maximum de 5 tests comportementaux. L'ensemble de ce projet nécessitera donc l'utilisation de 1344 animaux maximum pour une durée de 5 ans. En cas de stress trop important ou de souffrance des animaux, des points limites ont été définis pour les réduire au maximum. De plus, les animaux seront hébergés en groupe et dans des cages enrichies.

15216 Lors de la division cellulaire, une structure particulière, le fuseau mitotique, s'assemble et permet la séparation du matériel génétique en deux lots équivalents dans les cellules filles. Ce fuseau est composé de microtubules qui ont de nombreuses autres fonctions. La particularité des microtubules du fuseau est qu'ils ont subi des modifications post-traductionnelles lors de l'entrée en division. Le rôle de ces modifications dans l'assemblage et la fonction du fuseau mitotique n'ont quasiment pas été étudiés mais l'intérêt pour ces modifications s'est accru avec l'observation qu'elles sont perturbées dans de nombreuses cellules cancéreuses ainsi qu'à la suite de traitements anti-

cancéreux avec les taxotères. Il est devenu primordial de comprendre le rôle de ces modifications post-traductionnelles des microtubules au cours de la division cellulaire.

Les ovocytes sont de grosses cellules qui contiennent tout le matériel nécessaire pour réaliser 4000 divisions successives suite à la fécondation. Notre projet consiste à mettre des têtes spermatiques dans des extraits d'ovocytes afin de former des fuseaux mitotiques qui seront analysés par microscopie ou biochimiquement. En induisant ou en empêchant la formation des modifications post-traductionnelles des microtubules dans ces extraits, nous pourrions étudier le rôle de ces modifications sur la formation et le fonctionnement des fuseaux.

Xenopus laevis est un modèle unique largement utilisé pour l'étude de la division cellulaire. En effet les femelles *Xenopus laevis* pondent 2000 à 3000 ovocytes au cours d'une seule ponte. Chaque ponte permet d'obtenir 2 à 3 ml d'extrait d'ovocyte, une quantité qu'il est impossible d'obtenir à partir de cellules en culture.

Pour ce projet, des xénopes femelles seront injectées en sous-cutanée avec des hormones afin d'induire la ponte, les oeufs seront récoltés et les femelles seront mises au repos dans de grands bacs contenant des abris et cela pendant une période d'au moins 6 mois avant de les solliciter pour une nouvelle ponte. Les animaux ne seront donc soumis qu'à une injection sous-cutanée tous les 6 mois. Cette injection est faite par du personnel qualifié et l'absence de douleur est prouvée par l'absence de rétraction de l'animal. Ces animaux seront conservés au cours des 5 années d'expérimentation prévues dans ce projet et pourront ensuite faire l'objet d'une autre étude. Toutefois, si un animal montre des signes de perte d'activité il pourra être sacrifié. Nous prévoyons de stimuler la ponte d'un nombre minimum d'animaux (1-2 xénopes par semaine) et ceci parce que nous savons préparer des extraits cellulaires que nous aliquotons et qui peuvent se conserver quelques jours à -80°C. Il nous faudra donc 100 femelles pour assurer leur mise au repos pendant au moins 6 mois et pallier à d'éventuelles pertes même si celles-ci restent exceptionnelles.

15217 Le vieillissement est un processus complexe modulé par des facteurs environnementaux et génétiques. Chez l'Homme, des mutations dans certains gènes provoquent des syndromes de vieillissement prématuré, et de la sénescence cellulaire. Diverses voies génétiques ont été identifiées qui montrent une forte corrélation avec la longévité, à la fois chez l'Homme et dans des modèles murins.

Nous avons démontré *in vitro* que la sénescence cellulaire pouvait être inversée grâce à une stratégie de reprogrammation. Il semble possible de surmonter les barrières liées à l'âge, et de ralentir le processus de vieillissement en manipulant le destin des cellules pour améliorer la régénération des tissus.

Nous travaillons sur un projet basé sur cette connaissance pour étudier l'impact de la sénescence cellulaire dans la régénération tissulaire. Pour cela, nous utilisons un modèle murin atteint d'une pathologie de vieillissement accéléré récapitulant le syndrome humain de Hutchinson-Gilford encore appelé Progeria. Cette maladie rarissime est caractérisée par un vieillissement prématuré débutant dès la période néonatale. L'espérance de vie des patients atteints de progeria est très limitée 13 ans en moyenne.

Ce modèle murin Progeria est croisé avec un autre qui est génétiquement modifié afin de pouvoir induire une reprogrammation cellulaire transitoire *in vivo* et améliorer l'état de santé et la durée de vie.

Ce projet propose de suivre les aspects suivants durant la vie des animaux après induction de la reprogrammation transitoire homéostasie du glucose, composition corporelle, fonction musculaire, métabolisme respiratoire et analyse histologique des tissus.

Pour cette étude nous prévoyons d'utiliser 128 souris génétiquement modifiées.

Le suivi des animaux sera réalisé selon les règles en vigueur de la directive 2010/63 (surveillance quotidienne, soins et suivi, compétence et responsabilité du personnel, prise en charge de la douleur...). Les dispositions prises pour l'application de la règle des 3R sont les suivantes

- « Réduire » le nombre d'animaux en expérimentation :

Afin d'optimiser au mieux l'utilisation de tous les animaux produits, nous allons réaliser nos tests à la fois sur les mâles et les femelles. Par ailleurs nous utiliserons en contrôles les animaux issus des croisements de parents transgéniques hétérozygotes.

Le nombre d'animaux par groupe est fixé à 12, nombre nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement significatifs d'après nos analyses (description des tests statistiques utilisés détaillée ci-après). Le nombre de groupes a été réfléchi de sorte à avoir les contrôles suffisants pour pouvoir conclure quant aux résultats obtenus, il s'élève à 10 (4 groupes pour la population d'études, et 6 groupes contrôles) soit 120 animaux. 8 animaux supplémentaires sont ajoutés pour pallier aux décès éventuels en cours d'expérimentation.

Le nombre total d'animaux est de 128.

Du fait de la variabilité liée au sexe il est nécessaire de constituer des groupes de mâles et de femelles.

- « Raffiner » la méthodologie utilisée, ce qui implique la notion de points limites (critères d'interruption, ou "end-points")

Aucun dommage n'est attendu au cours de ce projet. Les procédures expérimentales étant non invasives, l'utilisation d'analgésiques ne sera pas nécessaire. Les animaux feront l'objet d'un suivi quotidien afin de prendre les mesures évitant toute souffrance éventuelle. Un délai d'acclimatation sera respecté dans les procédures nécessitant un isolement des animaux. L'ajout d'éléments d'enrichissement dans les cages sera systématiquement effectué (voir plus loin).

Ces souris présentent un phénotype de vieillissement accéléré (espérance de vie moyenne 40 semaines pour les hétérozygotes). L'examen journalier des souris sera effectué pour détecter et renseigner dans des fiches de suivi individuelles les premiers signes comportementaux de la douleur ou d'éventuelles anomalies (isolement, absence de mobilité, perte d'appétit, hérissure des poils, dos voûté...). L'état de santé des animaux sera évalué par le test de réflexe du retournement et de la capacité d'agrippement qui constitueront un point limite entraînant la mise à mort de l'animal.

Si une perte de poids supérieur à 20% du poids maximal est observée, les souris seront mises à mort et enlevées des lots expérimentaux.

Dès les premiers signes de difficultés de déplacement ou de nutrition, de la nourriture humidifiée sera ajoutée dans les cages.

Les souris seront divisées en 2 lots. Cette séparation est rendue nécessaire pour plusieurs raisons. Tout d'abord cela permet de limiter le nombre d'analyses faites sur chaque animal ce qui entrainerait un stress accru en particulier de par la nécessité d'isoler les animaux pour certaines expériences. De plus, les expériences de tests de tolérance au glucose nécessitent de faire jeûner les animaux ce qui pourrait introduire des biais d'analyse (variation trop importante des masses maigres et grasses des animaux) si les expériences s'effectuaient concomitamment aux expériences de cages métaboliques.

- « Remplacer » les modèles animaux

Nous avons déjà démontré *in vitro* que la sénescence cellulaire pouvait être inversée grâce à une stratégie de reprogrammation. Pour avancer, ce type d'analyse nécessite l'utilisation d'animaux puisqu'à l'heure actuelle, aucun modèle *in vitro* n'est capable de représenter la complexité de l'ensemble des mécanismes physiologiques et de métabolisme. Aussi, dans le cadre de ce projet, une étude sur l'organisme entier est nécessaire.

15218 Les pathologies de la surface oculaire représentent un des principaux motifs de consultation pour douleurs oculaires en Ophtalmologie. Ainsi, on estime qu'entre 15 et 25% de la population âgée de plus de 65 ans présente une sécheresse oculaire symptomatique avec douleurs. Cette douleur chronique de la surface oculaire entraîne, au-delà de la souffrance ressentie par les patients, une véritable atteinte de leur qualité de la vie puisque qu'on estime que près de 60% des patients sont gênés dans leurs activités quotidiennes. Parallèlement, 80% de ces patients douloureux estiment

que leur douleur n'est pas suffisamment prise en considération. En outre, la comorbidité de la douleur oculaire avec des syndromes d'anxiété et de dépression est importante.

La sensibilité somatique de la face, des cavités buccale et nasale, ainsi que des méninges est assurée, pour l'essentiel, par les trois branches du nerf trijumeau, les nerfs ophtalmiques, maxillaire et mandibulaire. Le nerf ophtalmique donne naissance aux nerfs ciliaires courts et longs responsables de l'importante innervation cornéenne. Cette densité en terminaisons nerveuses est une des caractéristiques remarquables de la cornée, ce qui en fait le tissu le plus innervé de l'organisme. En effet, il a été estimé que l'épithélium cornéen comprend 300 à 600 fois plus de terminaisons libres nerveuses que le derme et 20 à 40 fois plus que la pulpe dentaire. Les douleurs chroniques oculaires sont malheureusement parmi les plus invalidantes et les plus difficiles à traiter.

Le but de ce programme de recherche est d'évaluer les potentialités thérapeutiques de 4 composés pharmacologiques contre les douleurs trigéminées induites lors de la sécheresse oculaire.

Ce programme de recherche nécessitera l'utilisation de 1080 souris mâles adultes C57Bl6/J. Cette espèce est celle la plus utilisée à ce jour pour étudier et mieux comprendre les pathologies oculaires. De plus, à l'heure actuelle, il n'existe pas encore de systèmes *in vitro* pouvant mimer la pathologie étudiée. L'ensemble des animaux impliqués dans ce projet fera l'objet d'un suivi particulier quotidien par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié de l'animalerie après l'induction d'une sécheresse oculaire unilatérale. Toutes les mesures adéquates seront prises pour éviter une trop grande souffrance des animaux. L'ensemble des animaux disposera d'un enrichissement dans leur cage (bâton à ronger et maison en carton). Enfin, le nombre d'animaux utilisé est le minimum requis pour atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ».

15219 L'exposition à l'alcool au cours de la vie adulte entraîne des perturbations comportementales majeures qui s'expliquent en partie par la mise en place de phénomènes de dépendances dont l'élucidation des mécanismes moléculaires permettrait de fournir des pistes pour accompagner la sortie de ces pathologies. En collaboration avec une équipe leader dans les études d'impact de l'alcool sur le cerveau, notre laboratoire a exploré le rôle des facteurs de stress, HSF, suite à une alcoolisation chronique. Nous avons découvert qu'une inactivation du gène HSF2 induisait des effets similaires à un traitement chronique à l'alcool, sur la plasticité neuronale de l'hippocampe (un protocole mimant une prise d'alcool chronique chez l'adulte). Afin de compléter cette étude nous souhaitons voir l'effet de l'alcool administré de façon chronique ou aiguë sur les voies du stress, notamment en analysant des effets dans les animaux sauvages, comparés aux effets chez l'animal transgénique, inactivé pour le facteur de stress HSF2.

Nous étudierons l'effet de l'ingestion d'alcool par la souris adulte au niveau des structures spécifiques du cerveau d'animaux contrôle et transgéniques pour le gène HSF2, notamment concernant des variations d'expression de gènes, de composition en protéines et en métabolites d'intérêt dans le cerveau.

Les lignées d'animaux utilisés sont déjà maintenues dans notre animalerie l'inactivation du gène HSF2 ne leur cause pas de problème, son effet étant très subtil dans les conditions de vie normales en animalerie.

Nous testerons l'effet d'une alcoolisation chronique dans un protocole où l'animal a à sa disposition de l'eau et de l'alcool à 10% et un protocole d'alcoolisation aiguë, où l'animal reçoit trois injections d'une solution d'alcool à 3g/kg (poids de l'animal). Les animaux seront ensuite mis à mort et leur cerveau prélevé pour analyses moléculaires et cellulaires.

Les procédures décrites ci-dessus sont modérées, le traitement des animaux respecte la règle des 3 R nous utilisons, à chaque fois que c'est possible des modèles de cultures cellulaire neurales pour explorer les aspects moléculaires et ne conservons que les étapes de validation en condition physiologique chez l'animal. Nous veillons à enrichir les cages des animaux isolés en tunnel d'isolement, à surveiller les points limites régulièrement (perte de poids importante, prostration, poils hérissés) afin des sortir les animaux du protocole en cas de souffrance et la mise à mort se fait dans les conditions décrites en annexe IV de la directive ou selon un protocole précédé d'anesthésie.

Estimation du nombre d'animaux pour le projet 2 lots de 12 animaux (mâles et femelles séparés), pour chaque protocole d'alcoolisation avec chacun leur contrôle et un groupe témoin maintenu dans des conditions standards (6 groupes), soit au total 288 animaux sur la durée du projet.

15220 L'hypoparathyroïdie est une maladie endocrine rare et complexe, due à un défaut de sécrétion d'hormone parathyroïdienne. Elle est habituellement traitée par une association de calcium et de vitamine D active afin de minimiser les symptômes. L'évolution de l'hypoparathyroïdie est marquée par la survenue anormalement fréquente d'une insuffisance rénale, affectant 14 à 41 % des patients. Les études épidémiologiques montrent que le risque de développer une insuffisance rénale augmente avec la durée de la maladie et le nombre d'épisodes d'hypercalcémie induite par le traitement. Ces données issues d'observations ne montrent pas qu'il existe un lien de causalité entre le risque d'insuffisance rénale, la durée de la maladie et le nombre d'épisodes d'hypercalcémie.

Afin d'établir s'il existe un lien de causalité entre épisodes d'hypercalcémie et insuffisance rénale, nous utiliserons un modèle animal (rat) d'hypoparathyroïdie post-chirurgicale (la forme la plus fréquente d'hypoparathyroïdie). Quarante animaux seront utilisés dans cette étude. L'étude sera réalisée chez la femelle chez qui l'hypoparathyroïdie est plus fréquente que chez le mâle. Des épisodes répétés d'hypercalcémie seront induits par un traitement par fortes doses de vitamine D et un régime riche en calcium pendant 3 jours tous les 10 jours, ceci 5 fois. Le modèle permettra de savoir si les épisodes d'hypercalcémie sont capables de causer une insuffisance rénale, et d'en déterminer le mécanisme. Les résultats de ce travail permettront une amélioration de la prise en charge des patients.

Cette étude sera réalisée chez des rats adultes, femelles le rat est l'animal pour lequel le plus grand nombre d'informations à l'état basal est disponible, en particulier concernant la variabilité des variables biologiques. La quantité d'urine émise par ces animaux est grande, permettant de réaliser les recueils et les analyses dans de bonnes conditions. La règle des 3R a été appliquée le mieux possible lors de l'élaboration du protocole d'étude. Il n'y a pas d'alternative à cette étude *in vivo*, les modèles cellulaires existant ne permettant pas de rendre compte de la complexité du fonctionnement du rein intact. Le nombre d'animaux par groupe a été calculé en tenant compte de la variabilité des excrétions urinaires chez les animaux en fonction des conditions expérimentales, de l'hypothèse que les drogues ou régimes utilisés entraînent une variation de la fonction rénale d'au moins 20 %. Les mesures réalisées tiennent compte de l'état de l'art de manière à avoir la meilleure performance des mesures réalisées et réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Toutes les procédures le nécessitant et le permettant seront réalisées sous anesthésie. L'étude veille à assurer des conditions d'hébergement améliorées, à respecter les temps d'acclimatation, à user d'anesthésie et d'analgésie lorsque cela est nécessaire, à définir et surveiller les points limites.

15221 Contexte En France, l'infarctus du myocarde touche 100000 personnes par an. C'est une maladie grave et invalidante provoquée par l'occlusion d'une artère coronaire. Le seul traitement possible est de déboucher l'artère occluse. Bien que bénéfique, cela provoque également des lésions supplémentaires incluant la mort des cellules du cœur et une dysfonction cardiaque. Comprendre les mécanismes sous-jacents constitue donc un grand challenge pour les scientifiques. Au cours des dernières décennies, la prise en charge des patients souffrant d'un infarctus a commencé à s'améliorer, grâce à la meilleure compréhension des mécanismes des lésions d'ischémie-reperfusion, en parallèle du développement de stratégies de cardioprotection. Néanmoins, l'infarctus myocardique reste une maladie fréquente avec un devenir incertain, ce qui confirme la nécessité de constantes recherches pour mieux cibler les solutions thérapeutiques.

Objectifs : Dans la cellule du cœur, une structure intracellulaire importante pour la production d'énergie dans la cellule, la mitochondrie, est au centre de ces mécanismes cardioprotecteurs. Le réticulum, une autre structure servant de réservoir de calcium dans la cellule, semble aussi pouvoir jouer un rôle au cours de l'infarctus du myocarde. En effet, lors d'un stress, une trop grande quantité de calcium libérée par le réticulum peut provoquer la surcharge en calcium de la mitochondrie, dont

l'entrée est médiée par un canal appelé « uniport calcique mitochondrial », menant ainsi à la mort de la mitochondrie et donc de la cellule. Notre projet a pour objectif général de mieux comprendre le rôle de cette structure et sa régulation dans le contrôle de l'entrée de calcium dans la mitochondrie au cours de l'ischémie-reperfusion, afin de proposer une nouvelle stratégie de cardioprotection via l'inhibition transitoire de l'uniport et donc de l'entrée de calcium dans la mitochondrie à la reperfusion. Nous travaillerons avec un modèle murin d'ischémie-reperfusion cardiaque sous anesthésie gazeuse comme utilisé chez l'homme lors de chirurgie cardiaque il s'agit donc d'un modèle pré-clinique de référence de l'infarctus du myocarde largement utilisé dans la littérature et maîtrisé par notre laboratoire. Nous étudierons ainsi l'effet de l'ischémie-reperfusion cardiaque sur la composition, la localisation et la fonction de l'entrée de calcium dans la mitochondrie. Par ailleurs, nous chercherons à mieux comprendre l'impact de l'altération du passage du calcium du réticulum vers la mitochondrie sur l'uniport à l'aide d'outils d'imagerie. Enfin, nous étudierons le potentiel effet cardioprotecteur d'un anticancéreux utilisé en clinique humaine et récemment décrit comme inhibiteur réversible de l'entrée de calcium dans la mitochondrie, sur la taille d'infarctus et la fonction contractile chez la souris après ischémie-reperfusion cardiaque. Ce projet comporte donc 4 procédures pour un total maximum de 245 souris sur 5 ans.

Conformité de la règle des 3R

Remplacement Notre projet ayant pour but d'étudier la pathologie de l'infarctus du myocarde, le recours à l'expérimentation animale est nécessaire.

Réduction Le nombre d'animaux par procédure a été calculé à l'aide d'un logiciel de statistiques afin de déterminer le plus précisément possible le nombre minimal d'animaux permettant d'obtenir des résultats statistiquement exploitables, soit au maximum 245 animaux sur 5 ans. Par ailleurs, la procédure 4 impliquant l'étude de l'effet protecteur de l'inhibiteur sur la fonction contractile à long terme (1 mois) ne sera réalisée que si un effet protecteur est observé dans la procédure 3 par mesure de la taille d'infarctus.

Raffiner Dans le but d'améliorer le bien-être des animaux et ce, dès leur arrivée dans notre animalerie, un enrichissement de milieu est mis en place et renouvelé très régulièrement aussi bien avant l'expérimentation qu'en soins post-opératoires. Afin de supprimer la souffrance et la douleur, la chirurgie est entièrement réalisée sous anesthésie générale avec prémédication analgésique et anesthésique local. En soins post-opératoires, nourriture et boisson sous forme gélifiées seront mises à disposition de l'animal en plus de la nourriture et boisson habituelle, les groupes sociaux seront conservés et un protocole analgésique continu sera mis en place. Une fiche de suivi de chaque animal est complétée régulièrement afin de surveiller le comportement et la santé de l'animal pour ajuster les soins et l'analgésie apportés à l'animal, ou encore pour mettre fin au protocole en concertation avec le vétérinaire et le chef de projet.

En conclusion, lors des prélèvements finaux, d'autres tissus pourront être prélevés et conservés en concertation avec l'ensemble du laboratoire au moment de la mise en place du projet afin de limiter, optimiser et valoriser au mieux les prélèvements et le nombre d'animaux utilisés dans cette étude.

15222 Ce projet porte sur le développement et l'optimisation d'agents de transfection permettant le transport d'un vecteur contenant une séquence codant le gène d'intérêt dans le cadre de stratégies de thérapies géniques. Il s'inscrit dans le développement de nouveaux vecteurs toujours plus performants, d'acquérir des informations sur leur comportement afin de les optimiser mais aussi de mettre au point des techniques innovantes en termes d'approches thérapeutiques de maladies (comme la mucoviscidose, la dystrophie musculaire de Duchêne ou encore en cancérologie) et de nouvelles technologies. Nous voulons ici évaluer l'efficacité du transfert de gènes et observer la biodistribution de ce dernier chez l'animal après une administration par voie intra-veineuse. Ces agents de transfection sont issus de nos recherches, et préalablement testées de façon approfondie dans des conditions *in vitro*. La voie intra-veineuse permettant une injection dans tout l'organisme, des effets secondaires indésirables (qui ne peuvent être observés dans des conditions *in vitro*) peuvent apparaître chez l'animal c'est donc pour cela que la classe du protocole a été évaluée comme étant une classe modérée. La souris SWISS et la souris NMRI-Nude sont les deux espèces retenues pour ce protocole. Le nombre total d'animaux est de 420, réparti entre ces deux sous-

espèces. Il y a deux un lot témoin de 7 souris par espèce et 58 lots de 7 souris pour les différentes formulations à tester. Le suivi des animaux sera réalisé par luminescence et/ou fluorescence ce qui permet de limiter le nombre d'animaux nécessaires puisque ces derniers sont réintroduits dans leurs cages à la fin de l'imagerie, en bon accord avec la règle des 3R. Dans le cadre du remplacement, toutes nos expérimentations sont précédées d'une phase de test *in vitro* permettant de ne retenir que les molécules présentant les meilleures chances de succès. Le nombre d'animaux par lot est réduit au maximum sans mettre en péril l'obtention de résultats statistiquement exploitables. Ces expérimentations sont indispensables pour optimiser nos protocoles et nous permettre de faire un lien entre les résultats obtenus *in vitro* et un éventuel développement clinique. Le bien-être des animaux sera primordial durant ce projet, le raffinement sera assuré notamment par des phases d'acclimatation, un enrichissement de l'environnement et un suivi quotidien des animaux. A la fin de la procédure, les animaux seront mis à mort par élongation cervicale.

15223 Le but de ce projet est d'étudier comment la rétine transforme les stimuli visuels qu'elle reçoit sur ses photorécepteurs en potentiels d'action, envoyés par les cellules ganglionnaires au cerveau. Des travaux récents ont montré que la rétine est bien plus qu'une caméra, et qu'elle effectue des opérations très complexes sur la scène visuelle. Il est nécessaire de comprendre ces opérations, notamment pour pouvoir les émuler lors de stratégies de restauration de la vision de patients aveugles.

Dans ce projet, les études se feront *ex vivo* sur des rétines d'axolotls. Les rétines seront récupérées après euthanasie de l'animal selon une procédure spécifique. Le surdosage anesthésique n'est pas envisageable dans notre projet car les molécules peuvent potentiellement perturber le fonctionnement des neurones ce qui interférerait avec notre étude.

Au total, un maximum de 260 axolotls sera utilisé dans ce projet.

Nous avons pris soin dans cette étude du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ».

- Ces études ne peuvent être effectuées sur des modèles de cellules en culture car ils ne permettront pas l'étude de la transmission de l'information visuelle dans son ensemble.
- Le nombre d'animaux a été réduit au minimum pour pouvoir obtenir suffisamment de données statistiquement significatives et atteindre l'objectif scientifique de ce projet.
- Les animaux seront hébergés dans les conditions conformes à la réglementation et seront contrôlés par une personne compétente.

15224 Nous travaillons sur l'insuffisance cardiaque humaine due à des mutations du gène BAG3. Pour comprendre la physiopathologie des mutations faux-sens de ce gène nous allons utiliser un modèle de souris (appelé Knock-in ou KI) exprimant le gène BAG3 avec une mutation que nous avons identifiée comme causale de la maladie chez un patient atteint de cardiomyopathie dilatée. Cette lignée de souris peut servir comme un modèle murin de cette maladie, pour comprendre comment la protéine BAG3 mutée agit pour induire une cardiomyopathie dilatée. Le modèle sera donc étudié pour des paramètres fonctionnels (échocardiographie cardiaque) et après euthanasie pour des mesures moléculaires visant à déterminer les structures et fonctions cellulaires altérées. L'analyse de 80 animaux est prévue dans le projet.

(Remplacer) L'exploration d'un phénotype cardiaque physiologique ayant une origine génétique, comme c'est le cas de ce projet, nécessite le recours à un modèle mammifère, donc assez proche de l'humain, dont le génome est bien connu et pour lequel des procédures d'analyses fonctionnelles de l'organe entier (ici le cœur) *in vivo* sont éprouvées et standardisées. La souris remplit ces conditions. Par ailleurs la mutation BAG3 d'intérêt n'existe que dans cette espèce uniquement. Des modèles *ex vivo* de pseudo-organe cardiaque battant sont en cours de développement, dans notre laboratoire en particulier, mais sont trop immatures à ce stade pour espérer identifier les voies de la pathogenèse nécessaire à la mise au point de traitements éventuels pour l'homme. De tels modèles seront cependant utilisés quand cela sera adapté, pour valider certaines des découvertes réalisées sur le modèle murin et cela dans le but de limiter le recours à de plus nombreux animaux (Réduire).

(Réduire) La quantité d'animaux est réduite en limitant la taille des groupes et l'utilisation conjointe d'une approche statistique non-paramétrique (indiquée pour les petits effectifs). Le risque de manque de puissance de l'étude du fait de ces petits groupes (10 animaux par condition), et donc de l'inutilité de l'ensemble du projet, est très limité du fait des conséquences importantes des mutations BAG3 étudiés chez l'homme et de mutation KO déjà publiées chez la souris pour ce gène (effet important).

(Raffiner) Les procédures sont non invasives et le bien-être des animaux, en particulier en relation avec l'éventuelle dégradation de leur fonction cardiaque, sera surveillé. Il s'agit de fournir aux animaux un environnement enrichi avec du coton et des serpentins de carton. Les animaux ne restent pas seuls dans les cages. Les cages sont nettoyées une fois par semaine. La procédure d'échographie permettant le suivi de la fonction cardiaque est indolore puisque réalisée sous anesthésie légère respiratoire et sur une plaque chauffante pour éviter l'hypothermie.

15225 L'impact du métabolisme et donc de l'alimentation sur les cellules tumorales et immunitaires est un sujet de plus en plus étudié actuellement. Plusieurs travaux en littérature démontrent en effet que le métabolisme de ces cellules est une bonne cible pour le traitement anti-tumoral. Ainsi, le but de ce projet est de tester les effets de différents régimes alimentaires ainsi que certaines molécules (qui ont des effets sur le métabolisme) pour le traitement et la prophylaxie du cancer. Au sein de notre laboratoire, nous avons sélectionné *in vitro* des molécules inédites qui ont un effet anti-tumoral. Afin de valider le potentiel anti-cancérogène de ces molécules, nous allons les évaluer *in vivo*. Cette question ne peut être abordée qu'*in vivo* car ces molécules sont impliquées dans le métabolisme dont la complexité ne peut pas se reproduire dans des systèmes *in vitro*. Nous souhaiterons effectuer cette étude en utilisant au maximum des souris immunocompétentes (au nombre de 2676) et immunodéficientes (au nombre de 210). Ce projet se dessine sur 5 ans et implique des expériences d'évaluation du métabolisme et de croissance tumorale. Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des expérimentations a été mis au point afin de respecter les exigences de remplacement, réduction et raffinement pour permettre une interprétation fiable des résultats dans le respect du bien-être animal. Les expérimentations seront regroupées au maximum afin de réduire le nombre d'animaux contrôles. L'étude sera arrêtée si la procédure initiale invalide l'hypothèse de travail. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et adaptées en accord avec le personnel de l'animalerie (les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum; le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification et/ou tunnels en cartons). Les animaux sont observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être. La mise en place d'une grille de suivi strict des points limites permettra d'éviter au maximum le stress et/ou la douleur au cours de l'expérimentation. De plus, le personnel impliqué dans ce projet est qualifié sur le plan technique et formé en continu sur les pratiques d'expérimentation animale. Il assure également une veille scientifique continue, évitant toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature. Plusieurs tissus seront prélevés et soumis à diverses analyses (immunologiques, histologiques ou de biologie cellulaire et moléculaire) pour extraire le maximum de données de chaque expérimentation. Ces tissus seront également partagés avec nos collaborateurs dans le but de réduire le nombre d'animaux utilisés.

15226 Le fer est un élément essentiel pour de nombreux processus biologiques. Chez les mammifères le statut en fer circulant dans l'organisme et stocké dans les différents tissus est finement régulé par plusieurs mécanismes. La régulation du niveau de fer et la distribution du fer tissulaire est aussi modifiée lors d'une réaction inflammatoire. Cette redistribution du fer jouerait un rôle important dans la défense de l'organisme face aux agents pathogènes en limitant leur accès au fer. Ce projet vise à comprendre les interactions entre le métabolisme du fer et les réactions immunitaires mammifères. L'objectif est de définir le rôle du métabolisme du fer dans la réponse immune et les mécanismes métaboliques cruciaux qui interviennent dans nos réactions de défense contre les agents pathogènes. L'intérêt à terme est d'apporter des éléments d'amélioration de la thérapie contre les pathogènes.

Pour comprendre l'impact du métabolisme du fer sur la réponse inflammatoire et les mécanismes inflammatoires impliqués dans le métabolisme du fer, nous étudierons le modèle murin.

Partie 1 du projet

Les souris seront soumises à un régime alimentaire avec supplémentation ou déficience en fer. Puis, pour un groupe d'animaux pour chacun des régimes alimentaires la réponse inflammatoire sera stimulée par une molécule spécifique mimant la réponse à un agent pathogène (lipopolysaccharide (LPS), Pam3CSK4, polyIC, Imiquimod). La stimulation sera réalisée avec une faible dose qui, d'après notre expérience, n'induit aucun dommage chez la souris pendant le temps de l'étude. L'animal utilisé sera la souris de type sauvage C57BL/6 et BALB/c chacune connue pour répondre selon un mode de réponse inflammatoire différent (type 1 et type 2). Ces modèles nous permettront de caractériser les voies de régulation de statut en fer chez les mammifères en condition inflammatoire, ainsi que l'implication du métabolisme du fer sur la réaction immune.

Partie 2 du projet

La réaction inflammatoire est complexe et fait intervenir de nombreux acteurs. Les souris génétiquement déficientes (KO) pour des gènes codant des molécules impliquées dans la réaction inflammatoire seront utilisées pour étudier la redistribution fer dans l'organisme après induction de l'inflammation par le LPS. Ce projet a pour but d'identifier les acteurs de la régulation du métabolisme du fer dans les conditions inflammatoires.

Les modèles murins sont des outils précieux pour tester les réponses sous différentes conditions prédéterminées, qui ne sont pas réalisables chez l'homme, et qui permettront de mieux comprendre les processus liés au métabolisme du fer qui influencent la réponse immune et vice versa.

Les animaux sont élevés dans un environnement avec un statut sanitaire de type EOPS (Exempt d'organismes pathogènes spécifiques). Pour les expérimentation les animaux seront maintenues en animalerie conventionnelle en portoir ventilé. Une surveillance quotidienne des animaux y compris les week-ends est donc effectuée pendant la période d'acclimatation et d'expérimentation. Les conditions d'hébergement sont celles qui sont requises par l'annexe II de l'arrêté relatif à l'agrément des EU. Les animaux seront sacrifiés selon la réglementation en vigueur.

L'animal utilisé est la souris C57BL/6, BALB/c ou de lignées génétiquement modifiées pour l'invalidation d'un gène de la réponse immune et ne présentant pas d'immunodéficiences fortes dommageables, ni autre phénotype dommageable dans nos conditions expérimentales. L'exposition à une alimentation riche ou déficiente en fer sur les périodes expérimentales prévues n'induit pas de phénotype dommageable. La dose de molécule utilisée pour stimuler l'inflammation est faible et les souris soumises à cette stimulation ne présenteront pas de phénotype dommageable au cours de l'expérimentation.

Le projet représente un ensemble d'études réalisées durant la période de validité de l'autorisation. Le projet sur 5 ans comportera plusieurs études portant sur un total de 3744 souris.

A ce jour, l'animal de laboratoire reste le seul recours fiable et pertinent permettant d'étudier les mécanismes d'inflammation et de régulation qui nécessitent plusieurs niveaux d'interactions entre système immunitaire et métabolisme du fer, et ne peuvent être reproduits *in vitro* ou *in silico*. Ce projet sera réalisé en respectant les principes fondamentaux de l'expérimentation animale :

Remplacement le modèle animal est fondamental dans notre cas, puisque l'étude de l'inflammation et des effets pathologiques ne peut se faire que sur un organisme vivant entier.

Réduction le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement pertinents et reproductibles, évitant ainsi de refaire plusieurs fois les mêmes expérimentations.

Raffinement chaque procédure sera suivie quotidiennement pour s'assurer du bien-être des animaux et éviter au maximum la douleur au moment de l'expérimentation. Nous avons mis en place une grille de scoring et déterminé un point limite de manière à éviter une éventuelle souffrance.

15227 La Sclérose en Plaque (SEP) est une maladie inflammatoire et démyélinisante du système nerveux central. Première cause de handicap sévère non traumatique chez le jeune adulte, elle se traduit cliniquement par des perturbations motrices, sensitives et cognitives. Les traitements actuels ne permettent qu'une amélioration de la qualité de vie des patients et aucun d'entre eux n'est assez efficace pour freiner la progression de la maladie.

Le développement de nouveaux traitements nécessite une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents et des mesures plus précises de l'avancement de la maladie. Le but de ce projet est de mettre au point une mesure de la sévérité de la maladie dans deux modèles animaux de sclérose en plaque chez la souris, via une nouvelle technique de neuro-imagerie très sensible. A long terme, ces marqueurs permettront d'étudier précisément les mécanismes sous-jacents et aidera à la recherche de nouveaux traitements.

Le projet s'inscrit pleinement dans la démarche des 3R pour le bien-être des animaux

- Remplacer l'utilisation d'animaux de laboratoire est malheureusement nécessaire car l'étude est effectuée sur cerveau entier et fonctionnel et ne peut pas être remplacé par l'étude *in vitro*, *ex vivo* ou *in silico*.

- Les manipulations ont été raffinées pour qu'elles soient le moins invasives. Le choix des souris plutôt qu'un autre rongeur est notamment motivé par la possibilité d'imager de manière la moins invasive. D'autre part, les procédures chirurgicales incluent l'utilisation d'anesthésiques et d'analgésiques. Les animaux portant le modèle animal seront suivis attentivement et recevront des soins particuliers.

- Le nombre d'animaux utilisés a été réduit au maximum tout en s'assurant, par l'analyse statistique préalable, que les résultats seront statistiquement significatifs. Le maximum de mesures différentes seront effectuées sur le même groupe d'animaux grâce à des séquences d'acquisition optimisées.

Une surveillance régulière de leur mobilité et de leur bien-être (toiletage, pilo-érection, posture, poids) sera effectuée quotidiennement auprès des animaux. Ils seront hébergés en groupe dans des cages dans des armoires ventilées, avec enrichissement du milieu de type tunnel en carton. Ces travaux nécessiteront au maximum 320 souris mâles et 60 souris femelles C57Bl6 pour une durée de 5 ans.

15228 Pour satisfaire les besoins énergétiques élevés des ruminants à haut niveau de production, comme la vache laitière, des rations riches en glucides rapidement fermentescibles (GRF) sont classiquement utilisées. Ce type de ration, peut concourir à créer un dysfonctionnement du rumen (de type acidose), caractérisé par une diminution du pH du rumen et une augmentation de la production en acides gras volatils, avec comme conséquences un impact négatif sur les performances, la santé et le bien-être des animaux. Outre ces effets, certains travaux suggèrent que l'acidose pourrait aussi générer des modifications de l'équilibre acido-basique du sang et de l'état inflammatoire de l'animal. Pour limiter les effets négatifs de ces rations acidogènes, différents ingrédients peuvent être incorporés dans la ration alimentaire des probiotiques, des substances tampon ou des cultures de levures. Leur utilisation vise à modifier les conditions physico-chimiques et l'équilibre des populations microbiennes dans le rumen afin d'orienter le faciès fermentaire vers la formation de produits finaux de la digestion plus bénéfiques pour le métabolisme de l'animal. Parmi les probiotiques, l'effet positif des levures vivantes *Saccharomyces cerevisiae* sur les performances zootechniques des bovins et sur le métabolisme ruminal a été démontré. Parmi les substances tampons, le bicarbonate de sodium est très largement utilisé afin d'éviter une chute post-prandiale trop importante du pH ruminal. Enfin, parmi les ingrédients de type prébiotique, les cultures de levures ont démontré un intérêt pour l'amélioration des performances des ruminants. A ce jour, il convient d'établir plus clairement quel est le mode d'action spécifique de chacun de ces ingrédients afin de mieux en comprendre les effets dans un milieu biologique aussi particulier et complexe que le rumen ainsi que les effets à l'échelle de l'animal.

Huit vaches porteuses d'une canule ruminale sont nécessaires pour pouvoir obtenir des résultats valorisables d'un point de vue statistique et statuer sur le mode d'action respectif des 3 ingrédients étudiés. Les prélèvements de liquide ruminal seront réalisés uniquement via la canule ruminale, afin

de mesurer les paramètres du métabolisme du rumen (paramètres physico chimiques comme le pH et le potentiel rédox; paramètres fermentaires comme les acides gras volatiles, l'ammoniaque et l'acide lactique paramètres microbiologiques). Des prélèvements ponctuels de sang, de fèces et d'urine seront aussi effectués pour évaluer l'état acido-basique et inflammatoire de l'animal. Des incubations in situ de la ration permettront une évaluation de la digestibilité. Les animaux seront logés dans une installation agréée pour l'expérimentation, afin de leur assurer des conditions de confort et de bien-être.

15229 Le paludisme est encore la cause d'environ un demi-million de morts chaque année dans le monde. Le paludisme est provoqué par un parasite du genre Plasmodium qui est responsable de la quasi-totalité des cas de mortalité et partage son cycle de vie entre un moustique et l'être humain. Les formes sexuées du parasite se développent dans les globules rouges et sont les seules formes transmises au moustique. Le blocage de cette transmission apparaît une cible pertinente pour l'éradication de la maladie.

Dans un objectif de remplacement de l'expérimentation animale, une vaste campagne de criblage de plus de 20 000 composés a été réalisée *in vitro* et 70 composés ont été identifiés. Ces composés ont comme mécanisme d'action une rigidification du globule rouge parasité et peuvent provoquer leur élimination de la circulation sanguine par rétention dans la rate, empêchant la transmission du paludisme. Les mécanismes d'élimination ne peuvent être complètement mimés par des études *in vitro* puisqu'ils impliquent plusieurs tissus, conditions circulatoires et types cellulaires dans un contexte physiologique global. Aussi, la complexité et le coût des études cliniques d'élimination des gamétocytes par rétention splénique chez l'homme nous orientent vers une étape intermédiaire de vérification de nos hypothèses dans un modèle murin *in vivo*.

Afin de réduire le nombre d'animaux de l'étude, une analyse des résultats du criblage a permis la sélection de 3 de 70 composés qui ont un profil de sécurité optimal et une bonne pharmacocinétique. Notre objectif est maintenant de vérifier l'effet des 3 composés sélectionnés dans un modèle *in vivo* qui permettra de vérifier directement que l'effet observé *in vitro* se traduit par une élimination des globules rouges parasités de la circulation (par accumulation dans la rate).

Des souris immunodéprimées seront transfusées avec des globules rouges parasités pré-exposés aux 3 composés raidissant sélectionnés. Au total 102 souris seront utilisées dans ce projet d'une durée de 2 ans. Une expérience préliminaire sera d'abord réalisée sur 12 souris afin de déterminer la fenêtre d'élimination de globules rouges parasités rigidifiés (avec un composé raidissant contrôle). Les 90 autres souris permettront de vérifier l'effet des 3 composés sélectionnés sur l'élimination des globules rouges parasités de la circulation et leur accumulation dans la rate. Les souris seront hébergées pendant une semaine, puis l'agent immunodéprimant (clodronate) sera injecté et les parasites seront transfusés par voie rétro-orbitale avec anesthésie gazeuse à l'isoflurane. Le même jour, le sang périphérique sera prélevé et les souris seront sacrifiées. Les procédures sont également raffinées par un suivi régulier du comportement et de l'apparence physique ainsi que par l'enrichissement des cages d'animaux.

Cette série d'expériences permettra de vérifier *in vivo* la capacité de composés à bloquer la transmission du paludisme et est donc la dernière étape d'une séquence d'études précliniques d'identification et de validation de ces composés.

15230 Ce projet porte sur le développement et l'optimisation de transfert de gènes par l'utilisation de vecteurs synthétiques innovants dans le cadre de stratégies de thérapies géniques appliquées au traitement de myopathies comme la myopathie de Duchenne. Nous souhaitons ici évaluer l'efficacité du transfert de gènes *in vivo* de formulations et préalablement testées de façon approfondie en condition *in vitro*. Nos investigations nous ont permis de sélectionner différentes formulations représentant les candidates les plus intéressantes à tester au niveau des cellules musculaires. L'une des méthodes employées dans certaines études concernant la myopathie de Duchenne est une méthode hydrodynamique qui consiste à l'injection d'un volume important contenant la solution médicament. Cette méthode est localisée et n'impacte pas le reste de l'organisme.

Au cours de ce projet 200 souris Swiss seront utilisées. Ce nombre se répartie comme suit 19 lots de 10 souris qui auront les différentes formulations, un lot de 5 souris servant de contrôle et enfin un lot de 5 souris non injectées. L'administration se fait sur les deux membres postérieurs de la souris c'est pour cela que cette procédure est de classe modérée. Le suivi des animaux se fait par imagerie de bioluminescence car elle permet de limiter le nombre d'animaux nécessaires. En effet, par cette méthode, il est possible de réaliser plusieurs mesures sur un même animal. De plus, toutes les séances d'imagerie sont réalisées sous anesthésie gazeuse. Enfin, à la fin de la procédure certains animaux peuvent être gardé en vie afin d'intégrer un autre protocole permettant la réalisation d'imagerie par résonance magnétique (IRM). Cette procédure s'insère dans le respect de la règle des 3R. Dans le cadre du remplacement, toutes nos expérimentations sont précédées d'une phase de test *in vitro* permettant de ne retenir que les molécules présentant les meilleures chances de succès. La réduction du nombre d'animaux est au maximum sans mettre en péril l'obtention de résultats statistiquement exploitables. Ces expérimentations sont indispensables pour optimiser nos protocoles et nous permettre de faire un lien entre les résultats obtenus *in vitro* et un éventuel développement clinique. Le raffinement sera assuré notamment par des phases d'acclimatation, un enrichissement de l'environnement, un suivi quotidien des animaux ainsi qu'une gestion de la douleur suivant une échelle stricte et des points limites bien établis.

A la fin de la procédure, les animaux qui ne seront pas introduit dans le protocole IRM seront mis à mort par élongation cervicale.

15231 Le diabète et l'hyperglycémie provoque un phénomène appelé glycation qui entraîne des modifications fonctionnelles des protéines et cellules. Les globules rouges sont sujets à cette glycation ce qui provoque leur phagocytose par les cellules endothéliales aggravant les processus d'athérosclérose. De nombreuses plantes issues de la biodiversité sont réputées pour leurs propriétés anti-inflammatoires et "anti-diabétiques". Parmi ces plantes, le bois d'Osto (*Antirhea Borbonica*) est utilisé traditionnellement pour lutter contre le diabète et a été inscrit à la pharmacopée française, témoignant de sa non toxicité. Cependant peu d'études montrent réellement son intérêt thérapeutique sur des processus physiopathologiques *in vivo*. Des tests ont été menés au laboratoire sur l'impact du bois d'Osto sur la glycation des globules rouges induites par le méthylglyoxal (MGO). Cet agent glyquant est communément utilisé pour induire des modèles de glycation accélérée en substitution au glucose. L'accumulation de ce dérivé du métabolisme du glucose circulant dans le sang a été démontrée dans de nombreuses pathologies comme le diabète mais aussi les complications vasculaires.

Les résultats *in vitro* ont pu mettre en évidence que le bois d'osto prévient de façon significative la sénescence, et la perte des propriétés mécaniques des globules rouges (déformabilité, élasticité) induites par le MGO.

Pour conforter les effets observés du Bois d'Osto (*A. Borbonica*) sur un modèle *in vitro* d'érythrocytes glyqués, nous souhaitons réaliser des expériences similaires sur un modèle de globules rouges glyqués *in vivo* chez le poisson zèbre (60 poissons maximum/6-9mois), selon le protocole suivant

- 20 poissons seront traités comme contrôle (eau de l'aquarium uniquement) et injectés avec une solution saline

- 20 poissons seront traités comme contrôle (eau de l'aquarium uniquement) et injectés avec une solution MGO à 100 mg/kg (agent glyquant)

- 20 poissons seront traités pendant 48h avec une infusion de Bois d'Osto dilué dans de l'eau d'aquarium à la concentration de 0,5g/L (soit 8 fois moins concentré que les recommandations de la pharmacopée et présentant toutefois des propriétés intéressantes *in vitro*) et injectés au MGO à 100 mg/kg (agent glyquant)

Après l'injection, les poissons seront replacés dans leur aquarium respectifs contrôle ou avec l'infusion de bois d'Osto pendant une période supplémentaire de 24h.

Le lendemain, les poissons seront euthanasiés et le sang sera prélevé afin d'étudier la glycation des globules rouges par des techniques de cytométrie en flux et d'analyses biochimiques.

Remplacement Des études *in vivo* ont déjà montré la non toxicité/léthalité de la dose de MGO injectée à l'animal (chez la souris). Les expériences *in vitro* ont été réalisées et il faut désormais passer à l'expérimentation *in vivo* pour valider ces résultats.

Réduction les expérimentations ont été conçues afin d'utiliser le moins d'animaux possible, tout en permettant de réaliser des études statistiques (Student / Anova)

Raffinement les poissons seront placés dans des conditions optimales (cycle jour/nuit 14h/10h température 28.5°C oxygénation). Les animaux seront nourris plusieurs fois par jour et surveillés quant à leur comportement. Tous signes de stress, de souffrance et les points limites seront étudiés lors de l'expérimentation et rapportés minutieusement au vétérinaire afin de prendre les décisions adéquates et limiter la souffrance animale (anesthésie, euthanasie).

15232 La prématurité est la principale cause de décès et de handicaps chez les nouveau-nés. Dans les pays industrialisés, en raison de l'amélioration des soins intensifs néonataux, le nombre des nourrissons de très faible poids de naissance qui survivent au delà de l'enfance est en hausse. Cependant, le cerveau de ces prématurés reste extrêmement fragile.

La substance blanche du cerveau est le tissu constitué par les axones des neurones. C'est dans ces axones, entourés d'une gaine de protéine appelée myéline, que le signal nerveux circule. Les lésions diffuses de la substance blanche (LSB) constituent la principale forme de lésion cérébrale du prématuré. Les LSB sont majoritairement la conséquence de la présence d'une inflammation, qui peut être induite par différentes causes, par exemple une infection, pendant la fin de la grossesse et dans les jours suivant la naissance (période périnatale). Ce stress inflammatoire périnatal, subi par une grande majorité des enfants prématurés, atteint les cellules cérébrales qui sont encore en développement, et donc particulièrement vulnérables. Les LSB induisent des handicaps moteurs, des déficits cognitifs et des troubles comportementaux qui persistent à l'âge adulte. Malheureusement, aucune thérapie spécifique de ces lésions diffuses n'existe à ce jour. L'amélioration du pronostic de cette pathologie repose donc sur la découverte de nouvelles stratégies neuroprotectrices. Les objectifs de ce projet visent à tester les effets potentiellement thérapeutiques des cellules souches mésenchymateuses humaines (HuMSCs), qui sont des cellules immunitaires capables d'agir sur la réparation et la régénération des tissus, dans les lésions cérébrales induites par la neuroinflammation. Pour cela, nous utiliserons un modèle de LSB induites chez le raton par des injections intra-péritonéales d'interleukine 1 beta (IL-1B), une molécule qui induit l'inflammation. Ce modèle reproduit la pathologie humaine de l'enfant prématuré. Après avoir déterminé les meilleures doses et voie d'administration des HuMSCs (intra-nasale vs intra-veineuse), leur présence dans les différents organes, leurs effets spécifiques sur des cellules du cerveau (structure, activation, métabolisme, prolifération), et sur le comportement des animaux seront analysés.

Ce projet respecte la règle des 3R

Remplacement une partie des travaux de ce projet sera réalisée *in vitro* sur des cultures cellulaires. Le remplacement total des analyses *in vivo* par des stratégies *in vitro* n'est cependant pas envisageable actuellement, car les mécanismes impliqués dans les LSB mettent en jeu l'interaction de plusieurs types cellulaires au cours du développement cérébral qu'il est impossible de reproduire en culture. Il est donc indispensable d'associer, aux études *in vitro*, des études chez l'animal soumis à un stress inflammatoire qui reproduit les LSB.

Réduction

Il n'y a pas eu de mortalité ni d'inconfort des animaux lors d'expériences préliminaires avec une faible dose d'IL-1B, mais ces 1ers tests n'ont pas permis d'explorer la survenue de LSB ni les effets à long terme. L'étude prévoit donc de déterminer la dose d'IL-1B induisant l'apparition de LSB (définies par une présence de myéline anormalement basse) à 3 semaines, avec des signes d'inconfort limités (apparence de la peau et respiration normales, prise de poids non inférieure à 10% par rapport au poids moyen de la portée) et une mortalité $\leq 5\%$. Cet objectif de faible mortalité permet de prévoir un nombre d'animaux limité par groupe pour la suite de l'étude mais suffisant pour la réalisation d'analyses statistiques. Pour les analyses biologiques, on comptera n=6 rats par

groupes, +1 (n=7) pour les groupes recevant l'IL-1B, +2 (n=8) pour les groupes recevant l'IL-1B et les HuMSCs en intra-veineux. Chaque paramètre biologique sera mesuré dans des groupes recevant l'IL-1B et les HuMSCs (plusieurs doses et 2 voies d'administration), comparés aux groupes contrôles « IL-1B seul » (1 groupe), et « HuMSCs seules » (plusieurs doses et 2 voies d'administration). Pour l'analyse comportementale, tous les tests seront successivement réalisés sur les mêmes animaux, avec 2 séries de 20 animaux (n=40) prévues par groupe, +2 (n=44) pour les groupes recevant l'IL-1B, +4 (n=48) pour les groupes recevant l'IL-1B et les HuMSCs en intra-veineux. Au total, les expériences de ce projet seront réalisées chez 1051 rats au maximum, sur 5 ans, mais la détermination de la dose et de la voie d'administration des HuMSCs en début d'étude permettra de définir ces critères (1 dose et 1 voie ou 2 voies combinées) pour la suite de l'étude, et donc de réduire le nombre total d'animaux utilisés.

Raffinement l'injection intra-nasale, non-invasive, et les injections intra-péritonéales seront pratiquées sur animal éveillé par du personnel entraîné. L'injection intra-veineuse sera réalisée sous anesthésie. La surveillance des animaux sera quotidienne. Les critères de scores adaptés à l'âge des animaux (P1-P7 cyanose, déshydratation, respiration anormale, absence de prise de poids P7-P22 cyanose, déshydratation, poil ébouriffé, respiration anormale, absence de prise de poids après P22 déplacements dans la cage, cyanose, déshydratation, poil ébouriffé, respiration anormale, absence de prise de poids) seront relevés quotidiennement ou 2 fois par semaine pour identifier l'atteinte de points limites. En cas de prise de poids insuffisante (avant sevrage), ou de faible activité dans la cage (après sevrage), une réhydratation (sérum physiologique en sous cutané) sera mise en place. En cas d'atteinte des points limites, l'animal sera euthanasié.

A l'issue de toutes les procédures, les animaux seront euthanasiés pour prélèvements et analyses biologiques.

15233 En Europe, le traumatisme crânien (TC) est la cause la plus fréquente d'invalidité permanente chez les patients de moins de 40 ans. Aux lésions cérébrales primaires, engendrées par l'impact, se surajoutent, pendant les heures et les jours qui suivent, des lésions secondaires liées directement à la constitution des lésions primaires elles-mêmes, ainsi qu'à leurs conséquences locales sur le tissu nerveux. Les patients présentant un TC sont plus à risque de développer une maladie neurodégénérative, c'est à dire une altération progressive de leurs fonctions cognitives, dans les années suivants le traumatisme, appelée encéphalopathie chronique post-traumatique. Même si les mécanismes susceptibles de transformer cette lésion primaire mécanique en lésion dite tertiaire chronique et progressive sont encore flous, des preuves s'accumulent en faveur de l'implication de la neuroinflammation. La microglie est la principale cellule immunitaire du cerveau et on retrouve une activation des cellules microgliales persistant jusqu'à 17 ans après le TC. Les conséquences à long terme de l'inflammation sur l'activation microgliale suggèrent une « mémoire » cellulaire de l'inflammation par des mécanismes épigénétiques, c'est à dire des modifications dans l'état d'accessibilité de l'ADN dans le noyau de ces cellules, notamment par méthylation de l'ADN. La méthylation correspond à l'ajout d'un groupement "-méthyl" sur la molécule d'ADN. C'est une modification épigénétique favorisant la compaction de l'ADN, le rendant ainsi moins accessible à la transcription.

Les objectifs de ce projet sont de décrire, après un traumatisme crânien

- (1) Les modifications d'accessibilité de l'ADN
- (2) L'état de méthylation de l'ADN au sein des régions d'intérêt (nombre de résidus "- méthyl" ajoutés sur la molécule d'ADN)
- (3) L'activité des DNA-méthyl-transférases (DNMT), protéines responsables des phénomènes de méthylation de l'ADN.

Nous travaillerons sur un modèle de traumatisme crânien modéré par lâcher de poids (bille en acier de 10 grammes) d'une faible hauteur (10 cm, dans un tube adapté) sur des souriceaux de 7 jours. L'objectif sera évalué à différents âges de l'animal afin de mieux comprendre la chronologie de survenue des événements étudiés, en comparant systématiquement un groupe d'animaux chez qui

le traumatisme a été réalisé à un groupe contrôle. Au total, ces trois années de travaux nécessiteront 1600 souris mâles et femelles.

Cette étude prendra en compte la réglementation des 3R

- Remplacement L'étude de l'impact du traumatisme crânien sur les neurones à distance du TC ne peut être envisagée qu'« *in vivo* ». Au vu de notre expertise et des données de la littérature le modèle que nous utiliserons sera la souris OF1.

- Réduction Le nombre d'animaux estimé et les tests statistiques utilisés sont basés sur notre expérience pour ce type d'étude. Ce nombre minimum nous permettra d'être certains de répondre aux questions scientifiques de ce projet. Les analyses épigénétiques seront réalisées sur la plateforme Galaxy.eu.

- Raffinement La procédure chirurgicale (durée inférieure à 2 minutes) sera réalisée sous anesthésie générale inhalatoire. Une analgésie post-opératoire sera réalisée en la présence de signes de douleur (en fonction d'un score établi). Les animaux seront remis dans leur nid et on vérifiera que le retour au sein du nid se fait bien. Des grilles de scoring seront proposées en fonction de l'âge des animaux déterminants ainsi les points limites prédictifs à la phase aiguë, on surveillera la fréquence respiratoire, la recoloration des extrémités, et le tonus à distance du TC on réalisera une surveillance régulière de la prise de poids, de l'absence de troubles du comportement. Au terme de l'expérience, les animaux seront sacrifiés par surdosage en anesthésique.

15234 Le but du projet est l'étude du devenir d'un composé dans l'organisme suite à son administration. Cette étude pharmacocinétique chez l'animal permettra de déterminer des paramètres comme la concentration maximale dans le sang, le temps au bout duquel cette concentration est atteinte la demi-vie ou temps au bout duquel la quantité du composé est réduite de moitié (demi-vie d'élimination) pour ne citer que les principaux. Cette étude pré-requise dans le plan de développement d'un médicament, associée à des études évaluant l'activité pharmacologique du composé, est nécessaire afin de définir les doses qui seront administrées chez l'homme dans les premières études d'essais cliniques. A ce jour, des méthodes alternatives utilisant des modèles cellulaires par exemple se substituant au modèle animal n'ont pas été validées. Les produits seront administrés par différentes voies (voie orale, intraveineuse) puis le sang sera prélevé à différents temps. Les produits seront dosés dans le sang par des méthodes analytiques appropriées avec pour résultat de déterminer les constantes décrites ci-dessus. Deux procédures seront utilisées.

Une première procédure de Pharmacocinétique allégée va permettre de mettre au point la méthode analytique du dosage sanguin du composé. Le nombre maximal d'animaux utilisés sera de 2 espèces (rat et souris) x 3 animaux par temps de prélèvement x 3 temps de prélèvements x 2 sexes x 4 groupes (3 doses et témoin) x 5 produits étudiés x 3 voies d'administration (orale, intrapéritonéale, ou intraveineuse) soit 2160 animaux maximum (rats et souris) sur une durée de 5 ans.

La seconde procédure est l'étude de Pharmacocinétique proprement dite. Le nombre maximal d'animaux sera donc de 2 espèces (rat et souris) x 16 animaux (avec 10 temps de prélèvements et 5 échantillons par prélèvement) x 2 sexes x 4 groupes (3 doses et témoin) x 5 produits étudiés x 3 voies d'administration (orale, intrapéritonéale ou intraveineuse) soit 3840 animaux maximum (rats et souris) sur une durée de 5 ans. Compte tenu de la sensibilité des méthodes analytiques actuelles, le nombre d'échantillons sanguins et donc d'animaux a été réduit au minimum en particulier dans la procédure 2 où un même animal peut être prélevé à plusieurs temps.

Des études antérieures ont permis de choisir les doses du composé dénuées de toute toxicité ou d'effets délétères affectant le bien-être de l'animal. Néanmoins, la survenue d'une souffrance ou d'un stress chez les animaux sera identifiée au cours des études et des mesures seront mises en œuvre pour la réduire au minimum par l'adoption de points limites. Les prélèvements sanguins des animaux se feront sous anesthésie afin de réduire le stress de la manipulation. Les animaux seront placés sur des tapis chauffants lors de l'anesthésie pour éviter une hypothermie.

Les animaux seront hébergés en groupe, dans un environnement enrichi (tunnel, mouchoirs, sizzle dry...) et des bilans d'étape lors du déroulement du projet permettront d'améliorer les conditions expérimentales.

15235 La BPCO (bronchopneumopathie chronique obstructive) est une maladie respiratoire principalement causée par le tabagisme. Elle est caractérisée par une obstruction progressive et irréversible des bronches qui résulte d'un remodelage des bronches et d'une perte de l'élasticité du poumon liée à la destruction des alvéoles (emphysème)

L'emphysème se définit en termes de pathologie anatomique en tant qu'un élargissement anormal permanent des espaces aériens distaux aux bronchioles terminales, accompagné par la destruction de leurs parois.

En France, environ 3,5 millions de personnes, soit 6 à 8 % de la population adulte, sont atteintes de BPCO. Sur ce chiffre, un million de malades a atteint un stade symptomatique. Chaque année, la BPCO est responsable de 100 000 hospitalisations et 17 500 malades en meurent annuellement, soit 3 % des décès en France.

En Europe, 23 millions de personnes sont concernées par la BPCO. La BPCO est la cause de 3,4 % des décès et de 1,3 % des hospitalisations dans l'UE, où elle a tué 230 000 personnes en 2008. Les coûts annuels de santé et de perte de productivité dus à la BPCO sont estimés à 48,4 milliards d'euros en 2008.

Dans le Monde, selon l'OMS (organisation mondiale de la santé), la BPCO deviendra la 4ème cause de décès dans le monde en 2030, après l'infarctus, les accidents vasculaires cérébraux, les infections respiratoires communautaires et la tuberculose.

Les symptômes les plus communs de la BPCO sont la dyspnée, ou « manque d'air », la production excessive de crachat, et une toux chronique.

Le traitement pharmacologique permet de prévenir et de contrôler les symptômes de la BPCO, de diminuer la fréquence et la sévérité des exacerbations, d'améliorer l'état de santé et de bonifier la tolérance à l'exercice. Il n'existe pas, à l'heure actuelle, de traitement spécifique et réellement efficace contre la BPCO. Le traitement repose sur des bronchodilatateurs à courte durée d'action (β 2-agonistes, les anticholinergiques et les méthylxanthines), les bronchodilatateurs à longue durée d'action (tiotropium, salmeterol, formoterol) et les corticostéroïdes inhalés, mais ces molécules sont peu efficaces et n'empêchent pas le développement de l'emphysème. C'est pourquoi l'étude de nouvelles molécules thérapeutiques est nécessaire.

Chez la souris, nous avons développé et validé un modèle murin qui reproduit la pathologie décrite précédemment.

In vitro, des études ont déjà été réalisées sur cette pathologie

La phase préclinique qui consiste à l'étude de l'action des agents pharmacologiques *in vivo* chez le rongeur est une étape essentielle dans le développement de médicaments. Ce projet a pour but de tester de nouveaux médicaments contre le développement de l'emphysème et des anti-inflammatoires. Les animaux sont exposés 3 fois par jour à la fumée de cigarettes de référence type 3R4F (Tobacco health research, University of Kentucky, USA) ou autres références commercialisées chez les buralistes. Les animaux seront ensuite mis à mort au bout de 4 jours (phase inflammatoire) ou entre 6 à 16 semaines (phase d'emphysème) afin d'analyser différents paramètres immunologiques et histologiques. Ceci permettra d'étudier l'efficacité des molécules testées sur le développement de la maladie.

L'animal utilisé est la souris C57BL/6 ou BALB/c. Ce modèle induit des douleurs inflammatoires aiguës à l'animal, liées au développement de la maladie pulmonaire. Une surveillance quotidienne des animaux y compris les week-ends est effectuée pendant la période d'acclimatation et d'expérimentation. Les animaux sont hébergés par 5 maximum dans des cages de 530 cm² à fond plein sur portoir ventilé. Pour chaque étude, un registre électronique de suivi journalier de poids individuel des animaux et du score est rattaché à chaque expérience et est expertisé tous les six

mois par le responsable de suivi du bien-être animal (SBEA). De plus, une procédure d'urgence est affichée en animalerie si besoin.

Le projet représente un ensemble d'études types. Le nombre d'études réalisées durant la période de validité de l'autorisation dépendra du nombre de molécules à tester. Le projet pourra comporter jusqu'à 20 études, incluant au maximum 90 animaux, soit 1800 animaux au total.

A ce jour, l'animal de laboratoire reste le seul recours fiable et pertinent permettant de tester des nouvelles molécules thérapeutiques ciblant la fibrose pulmonaire idiopathique. Ce projet sera réalisé en respectant les principes fondamentaux de l'expérimentation animale

-Remplacement le modèle animal est fondamental dans notre cas, puisque l'étude de l'inflammation et de la pathologie ne peut se faire que sur un organisme vivant entier.

-Raffinement Les animaux sont observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être et d'éviter au maximum leur douleur au moment de l'expérimentation. Des points limites adaptés sont mis en place et appliqués afin de limiter la souffrance de l'animal.

-Réduction Le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats pertinents et reproductibles, évitant ainsi de refaire plusieurs fois les mêmes expérimentations.

15236 La plupart des primates explorent leur environnement sur la base d'informations visuelles. Cette prédominance visuelle est supportée par un système cérébral d'orientation de la fovéa (zone centrale du regard) vers les objets d'intérêts. Il existe 2 types de mouvements des yeux 1 les saccades oculaires—mouvements rapides et balistiques, et 2 les mouvements de poursuites lentes, qui permettent de suivre du regard un objet en mouvement. Un grand nombre d'études a montré l'importance de plusieurs aires corticales distribuées principalement entre le cortex préfrontal et pariétal et la pertinence du modèle primate (en particulier les macaques). En particulier, 2 aires fortement interconnectées font l'objet d'études approfondies le champ oculomoteur frontal (FEF pour Frontal Eye Field) et l'aire latérale intrapariétale (LIP pour Lateral Intraparietal). De façon remarquable, les neurones de FEF et de LIP se comportent similairement lors du contrôle oculomoteur, sans toutefois que ces études ne les comparent directement et simultanément. Leurs rôles et interactions respectifs restent donc inconnus. Il est primordial de comparer directement l'activité des neurones de ces aires au cours de différentes tâches oculomotrices. Le but de ce projet est d'explorer les interactions entre LIP et FEF lors de différents comportements oculomoteurs.

Une des raisons de cette confusion est avant tout méthodologique. Chez le macaque (modèle de prédilection) il est compliqué d'enregistrer simultanément l'activité de larges populations de neurones de FEF et LIP. Une solution innovante serait d'implanter dans chacune de ces aires des matrices d'électrodes. Hors, LIP et FEF sont situés dans des sillons. Y implanter des matrices constitue donc une difficulté méthodologique majeure rarement accomplie à l'heure actuelle. De plus les nouvelles méthodes d'exploration fonctionnelle (notamment optogénétiques) sont peu efficaces chez les macaques. Bien que le modèle macaque reste d'un intérêt majeur pour ces études, il est nécessaire de développer un modèle complémentaire dans lequel ces aires ne sont pas situées dans des sillons et où les méthodes d'optogénétiques sont potentiellement plus efficaces. Cela passe par la validation préalable d'un nouveau modèle et la comparaison directe des résultats entre les 2 espèces. Répondre à la problématique de ce projet est donc centré autour de 2 axes méthodologiques complémentaires : 1. développer des méthodes d'implantation de matrices d'électrodes dans LIP et FEF chez des macaques 2 développer et valider un modèle de primate non humain (PNH) différent, le marmouset (*Callithrix jacchus*), dont le cerveau est lissencéphalique (sans sillon, LIP et FEF sont situés en surface), et plus petit et donc plus sensible aux méthodes optogénétiques. Cela passe par la comparaison directe des résultats obtenus chez les 2 modèles.

- Objectifs du projet

Ce projet couple un but scientifique—la compréhension des comportements oculomoteurs—à un développement méthodologique double qui permettra d'accéder à un nouveau type de données chez un nouveau modèle animal. Il vise à comprendre les interactions LIP/FEF lors de contrôles oculomoteurs en y enregistrant simultanément l'activité de populations de neurones. Nous

comparerons les résultats obtenus chez le macaque et le marmouset à l'aide de méthodes et de tâches comportementales similaires. Le développement méthodologique nécessitera d'abord l'utilisation d'animaux anesthésiés sans phase de réveil où nous cartographierons finement FEF et LIP. Ensuite, nous entraînerons 3 macaques et 4 marmousets à effectuer plusieurs tâches oculomotrices. Nous implanterons, à l'aide des données récoltées dans la phase sans réveil, dans FEF et LIP des matrices d'électrodes laminaires permettant d'enregistrer une grande quantité de neurones simultanément, d'avoir accès à leur emplacement au sein des couches corticales et ainsi mieux définir leur connectivité. Le développement de ces nouvelles méthodes ouvre des perspectives enthousiasmantes dans l'étude des interactions corticales.

- Bénéfices potentiels pour la société

Ce projet nous permettra de mieux comprendre le fonctionnement du système oculomoteur. Les bénéfices sont avant tout liés à des apports de connaissance fondamentale. De plus, méthodologiquement, développer ces méthodes d'implantation de matrices dans ces sillons nous permettra à long terme d'accéder à des données plus riches et raffinées sur des thématiques cognitives de très haute importance telles l'attention, la mémoire de travail ou la prise de décision. Finalement, le développement du modèle marmouset pour ces problématiques permettra à terme d'utiliser les nouvelles méthodes (optogénétique), et donc de raffiner nos données expérimentales.

- Dommages potentiels pour les animaux

Les animaux dédiés aux procédures sans réveil seront mis à mort à la fin de la procédure. Toutes les mesures seront prises pour que cette étape se fasse sans douleur ou stress pour l'animal. De plus, ces animaux proviendront d'autres protocoles expérimentaux.

Les procédures éveillées se feront dans le respect du bien-être des animaux. Les procédures d'entraînements seront incrémentielles de telle sorte à réduire au maximum le stress des animaux et maximiser leur bien-être.

- Ce projet s'inscrit pleinement dans la règle des 3R.

Remplacer Acquérir l'activité de neurones est invasif et ne peut pas être fait chez les humains. Il n'existe pas de modèle artificiel des comportements étudiés et des mécanismes les sous tendant, empêchant l'expérimentation *in silico* ou *ex vivo*. En raison de la proximité anatomo-fonctionnelle des structures étudiées avec celles de l'humain, les PNH sont le modèle approprié.

Réduire Nous réduirons le nombre d'animaux utilisés au minimum accepté par la communauté scientifique : 4 macaques et 4 marmousets anesthésiés (3 voire 2 si les résultats le permettent); 3 macaques et 4 marmousets éveillés (2 et 3 si les résultats le permettent). Clarifier les relations FEF/LIP permettra de réduire les besoins en explorations invasives généralement menées de manière séparée dans ces 2 aires

Raffiner Les procédures chirurgicales invasives seront effectuées sous anesthésie générale et une médication appropriée sera fournie afin de minimiser les souffrances et le stress liés aux chirurgies. Les phases d'apprentissage seront incrémentielles pour réduire le stress.

De plus, les nouvelles méthodes d'enregistrement permettront d'acquérir des données nouvelles, raffinant la qualité des données obtenues par rapport aux standards actuels.

15237 Il existe actuellement une augmentation du nombre de cancers chez les jeunes enfants d'environ 0,6% par année, associée à une amélioration des traitements anti-cancéreux. En conséquence des jeunes adultes de plus en plus nombreux vont devoir faire face aux séquelles potentielles des traitements, parmi lesquelles les difficultés à concevoir un enfant. L'impact de ces traitements sur la fertilité varie en fonction de plusieurs éléments du type de traitement, du type de molécule, de la chirurgie effectuée, du sexe du patient et de son âge.

La méthode de préservation de la fertilité pour les jeunes filles n'ayant pas encore réalisées leur puberté actuellement proposée reste au stade expérimental. En effet c'est la congélation de morceaux d'ovaire qui reste la seule solution existante pour permettre aux jeunes filles pré-pubères de préserver leur fertilité avant un traitement potentiellement stérilisant radiothérapie et/ou chimiothérapie par exemple. La méthode utilisée actuellement est une méthode de congélation

lente utilisant des agents anti-gèles qui rentrent dans les cellules qui sont connus pour leur toxicité et pouvant entraîner des dommages cellulaires ou génétiques, ceux-ci étant corrélés aux concentrations utilisées. De plus la survie des follicules primordiaux (à l'origine des ovocytes) de ces patientes est plutôt médiocre avec cette technique de congélation de l'ordre de 50% des follicules intacts après décongélation. Il a été développé un gel à base d'un sucre qui est compatible avec les tissus vivants et qui a aussi démontré son absence de toxicité. Il possède notamment des propriétés d'absorption du milieu liquide environnant et a été testé dans la congélation de cellules musculaires de souris avec des résultats très encourageants et déjà publiés. Notre objectif est d'adapter ce gel à la congélation de cortex ovarien ce qui nous permettrait de diminuer de façon importante les concentrations en agents anti-gèles et ainsi leurs effets secondaires, mais aussi d'améliorer les résultats de la congélation de cortex ovarien (proportion de follicules intacts après décongélation).

Le modèle d'autogreffe d'ovaire chez la souris, où la souris hôte est la même que le souris source, sous la capsule rénale est le modèle le mieux adapté afin d'étudier la reprise post congélation/décongélation d'un ovaire greffé. En effet il permet d'évaluer le développement des follicules et leur survie. Ceux-ci sont à l'origine des ovocytes nécessaires à la reproduction. De plus il permet d'étudier la fonction endocrine de l'ovaire, c'est-à-dire les hormones qu'il sécrète dans le sang et qui permettent la régulation de plusieurs processus comme le cycle menstruel ou la puberté. Il permet donc de refléter au mieux le processus de congélation/décongélation et de greffe de cortex ovarien chez l'humain et les attentes que l'on peut en avoir en application clinique.

Notre projet nécessite d'avoir recours à des souris car à ce jour il n'existe pas de méthodes alternatives pour modéliser la greffe d'ovaire post congélation/décongélation, l'utilisation d'un modèle animal est donc nécessaire pour évaluer l'efficacité de ce dispositif de congélation.

Cependant nous avons voulu limiter le nombre d'animaux utilisés et leurs souffrances.

Tout d'abord des mesures nécessaires seront prises pour limiter la douleur et le stress des animaux par l'utilisation d'anesthésiants et d'analgésiques au cours des différentes interventions prélèvement des ovaires puis autogreffe. Un suivi du bien-être des animaux sera effectué par des personnes compétentes au cours de ce projet avec un contrôle régulier de l'état de santé des animaux avec recours aux analgésiques si nécessaires. Des points limites précoces de bien-être et d'état de santé des souris ont été définis avec la mise en place d'une grille d'évaluation basée sur l'apparence physique et la mobilité des animaux.

Pour réaliser cette étude nous avons tenu compte du nombre minimal d'animaux à étudier de façon à obtenir les informations scientifiques recherchées. Ainsi le nombre d'animaux utilisés pour la période du projet a été évalué à 60 pour la totalité du projet 20 souris par groupe (un groupe référence, un groupe expérimental et un groupe contrôle). Le projet sera effectué sur une période d'un an. L'ensemble des animaux sera euthanasié à la fin de l'expérience après anesthésie.

15238 Dans le cadre de nos travaux de recherche sur les virus à transmission vectorielle (arbovirus), nous étudions les interactions hôte-pathogène et la réponse immunitaire stimulé en réponse à l'agent infectieux. Afin de suivre le processus infectieux chez l'hôte et caractériser les voies cellulaires et immunitaires activées dont les marqueurs de l'inflammation, il est nécessaire de disposer d'outils de détection qui participent à la mise en place de tests biochimiques et biologiques sensibles et spécifiques. L'hyper-immunisation de souris adulte BALB/c vis-à-vis d'antigènes recombinants d'origine virale ou de protéines impliquées dans les mécanismes de défense de l'hôte est une méthode privilégiée pour la production en quantité suffisante d'anticorps polyclonaux mono-spécifiques ou d'anticorps monoclonaux dirigés contre des épitopes de la protéine d'intérêt. Dans ce dernier cas, il est nécessaire de récupérer les splénocytes (la source majeure de cellules B productrices d'anticorps) des souris hyperimmunisées et de les immortaliser avec des cellules de myélome SP2/O. L'hybridome ainsi obtenu est cloné et caractériser pour la production d'un anticorps monoclonal stable. La mise en place d'un nouvel hybridome ne sera décidée que si l'anticorps monoclonal n'est pas disponible dans le commerce ou trop difficile à acquérir surtout dans un territoire ultra-marin.

Nos études nécessitent de disposer d'anticorps polyclonaux et monoclonaux dirigés contre différentes protéines d'intérêt dont celles du virus à étudier. Il est fréquent que face à l'émergence d'un nouveau pathogène comme le virus Zika ou la résurgence d'un pathogène comme le virus de la dengue à La Réunion les anticorps de détection de l'agent infectieux soient manquants ou trop peu spécifiques et/ou sensibles pour effectuer sa recherche dans un tissu infecté par exemple.

Le protocole d'immunisation de la souris par une antigène ou une protéine d'intérêt nécessite une durée jusqu'à 35 jours après une série d'injections en présence d'adjuvant de Freund incomplet qui génère une douleur modérée à l'endroit de l'injection durant 24 h environ. Cinq souris seront utilisées pour chaque antigène testé. Le projet est prévu sur 5 ans.

Pour les immunisations, seront programmés 10 antigènes par année avec un groupe de 5 souris par antigène soit sur 5 ans, l'immunisation de 250 souris. Pour la réalisation des cultures d'hybridomes *in vitro*, cela nécessite des macrophages péritonéales obtenus par lavage avec 3 souris pour chaque fusion. Pour réduire le nombre d'animaux, la fusion ne sera pas faite avec les 5 rates des 5 souris, mais avec la rate de la souris donant la meilleure réponse anticorps par ELISA, soit l'utilisation de 150 souris pour cette partie sur les 5 ans. Le nombre total d'animaux sera donc de 400 souris sur les 5 ans. La lignée murine BALB/c est communément utilisée pour la production d'anticorps contre des composés d'origine virale ou cellulaire car ces souris sont considérées comme bonnes répondeuses immunologiques suite à l'injection répétée d'un antigène considéré. Cette lignée sera donc utilisée.

Les souris seront placées dans des cages munies d'enrichissement pour limiter leur stress. Des prélèvements réguliers permettront de contribuer au raffinement pour arrêter la procédure à l'issue des 35 jours et ne pas faire des fusions si les antigènes n'induisent pas de réponse suffisante en ELISA. Suite aux injections, l'état de santé des souris sera observé quotidiennement. Lors des prélèvements, les souris seront mises sous anesthésie gazeuse (isoflurane 2-3%), sur un plateau chauffant pour éviter l'hypothermie.

15239 Ce projet a pour objectif principal d'étudier le profil pharmacocinétique (processus d'absorption, distribution, métabolisation et élimination) d'une molécule chez le porc. L'étude pharmacocinétique est une étape importante dans le développement du médicament, car une molécule peu absorbée ou rapidement éliminée a peu de chance d'être efficace chez l'homme. Pour cela, des prélèvements sanguins et/ou urinaires répétés sont réalisés chez le porc vigile après l'administration du candidat-médicament (et éventuellement du véhicule ayant servi à sa formulation). Ces prélèvements (sang et urine) seront utilisés pour mesurer au cours du temps la concentration du candidat-médicament administré et/ou de ses métabolites, et éventuellement la concentration de différents marqueurs biologiques pertinents.

De même des biopsies diverses (par exemple de peau) peuvent être réalisées pour doser dans le temps la concentration du candidat-médicament administré et/ou de ses métabolites et éventuellement la concentration de différents marqueurs biologiques pertinents dans certains organes ou systèmes cibles.

Le nombre prévisionnel maximum d'animaux est de 108 porcs sur 5 ans.

La conception de ce projet prend en compte la règle des 3R :

- Remplacement Dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez le porc car il n'existe pas de méthode de substitution (*in vitro* ou *in silico*) pour étudier la pharmacocinétique d'un candidat-médicament. Or, avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité, la toxicité et la pharmacocinétique d'un candidat-médicament. A ce jour, le porc est l'une des espèces les plus adaptées à ce type de modèle d'étude.
- Réduction Un nombre minimal et homogène d'animaux par groupe est utilisé afin d'exploiter de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et afin d'avoir un nombre d'animaux suffisant pour réaliser une analyse statistique.

- Raffinement Dans ce projet, le raffinement est obtenu par la familiarisation et l'entraînement régulier des animaux aux procédures expérimentales avec un renforcement positif le prélèvement d'un volume minimal de sang grâce à l'amélioration de la sensibilité des techniques de dosages
- . un suivi quotidien de l'état de santé des animaux
- . le suivi post-opératoire de l'état de santé des animaux ainsi que des soins adaptés afin de permettre une bonne récupération des animaux
- . le recours à des procédures les moins invasives possibles
- . le suivi d'éventuel signes cliniques
- . la détermination des points limites

15240 Les Cancers du Sein Triples Négatifs (CSTN) forment un sous-type agressif représentant 15% des tumeurs du sein et il est proposé que leur agressivité pourrait être liée à leur composition riche en cellules souches cancéreuses (CSC). Les cellules souches cancéreuses sont capables de régénérer une tumeur dans sa diversité originelle.

Si les caractéristiques des cellules souches cancéreuses sont désormais connues dans plusieurs types de tumeurs, leur identification reste imparfaite dans les cancers du sein. Notre équipe a montré que dans les CSTN 2 à 8% des cellules tumorales co-expriment deux récepteurs tyrosine kinase (RTK), les récepteurs AXL et ROR1. Les cellules AXL+/ROR1+ présentent en culture des propriétés proches des Cellules Souches Cancéreuses.

Cependant, pour confirmer que les cellules AXL+/ROR1+ correspondent bien à des cellules souches cancéreuses, il est indispensable de vérifier qu'elles sont capables de former des tumeurs après injection sous-cutanée à des souris immuno-déprimées. Le test classiquement mis en oeuvre consiste à injecter des quantités décroissantes de cellules tumorales (entre 1 million et 500 cellules) et les sous-populations cellulaires capables de produire de façon reproductibles des tumeurs à partir de 500 cellules pourront être considérées comme des cellules souches cancéreuses.

Nous allons donc isoler par tri cellulaires des cellules AXL+/ROR1+ et des cellules AXL-/ROR1-, les mélanger avec du matrigel et procéder à des injections sous-cutanées sur des souris immuno-déprimées de la souche Swiss/Nude. Comme précisé plus haut nous injecterons des quantités décroissantes (1 million, 500.000, 100.000, 50.000, 5000, 500). Chaque type d'injection (quantité de cellules) sera réalisé sur 6 souris en parallèle. Les souris seront gardées en observation pour un maximum de 6 mois et la présence de tumeurs vérifiée chaque semaine. Les animaux seront sacrifiés lorsque la tumeur aura atteint un maximum de 700 mm³ ou en cas de signe de détresse ou souffrance (en référence aux points limites). Si aucune tumeur n'est détectée à l'issu des 6 mois la condition sera considérée comme négative.

- Remplacer Nous avons toujours recours aux tests *in vitro* en première intention, mais le test *in vivo* (formation de tumeurs après injection sous-cutanée) reste indispensable pour démontrer le caractère souche d'une sous-population de cellules tumorales et aucune méthode de substitution ne fait consensus.

- Réduire : Nous comparerons 3 lignées cellulaires avec 3 conditions et 2 lignées avec 2 conditions, avec pour chaque condition 4 quantités de cellules correspondant à des tests de dilution. Ceci correspondant à 52 conditions à tester et pour chaque condition 6 animaux seront injectés. Pour des questions de robustesse statistique, il n'est pas raisonnable de réduire ce nombre. Nous allons injecter en sous- cutané à des souris immuno-déprimées de type Nude des fractions triées au FACS trieur de cellules AXL+/ROR1+ et comparer leur capacité à former des tumeurs à celle des fractions cellulaires AXL-/ROR1-. Ainsi, ce projet nécessitera l'utilisation de 468 souris sur une durée de 2 ans et demi.

- Raffiner : La seule procédure invasive que les animaux auront à subir sera l'injection des dilutions cellulaires au début. Puis les animaux feront l'objet d'une surveillance quotidienne et la croissance de la tumeur sera vérifiée une fois par semaine. Après 6 mois d'observation les souris seront sacrifiées ou si la tumeur atteint un volume compris entre 500 et 700 mm³. Si après 6 mois aucune tumeur n'est apparue, la condition sera considérée comme non tumorigène.

Nous appliquerons toutes les procédures classiques de surveillance des points limites tels que la réduction de 20 % de la masse corporelle de même que des signes de souffrance ou de détresse que nous surveillerons attentivement.

- absence d'hydratation ou de prise de nourriture

- gêne dans la locomotion, yeux fermés ou creux, le dos voûté, saignement ou autre perte de liquide physiologique, ulcération, infection sur le site de la tumeur

- Tout autre comportement anormal de l'animal tel que la prostration ou la vocalise lors de la préhension

Un analgésique sera administré aux souris pour toute manipulation pouvant engendrer de la douleur ou si des signes de douleur se manifestait.

15241 Une mammite est une réaction inflammatoire de la glande mammaire, en réponse à un traumatisme de nature physique ou infectieuse. Dans la majorité des cas les mammites sont d'origine bactérienne. L'infection de la mamelle se traduit par une diminution de la production de lait, une modification de sa composition (augmentation de la concentration des cellules somatiques, apparition de grumeaux...), apparition de signes cliniques (gonflement, induration, chaleur, douleur) avec des variations importantes en fonction de la sévérité et de l'agent infectieux impliqué. En dehors des conséquences économiques importantes en élevage laitier, elle impacte le bien-être de l'animal et induit des risques pour la santé humaine lors de la consommation de lait infecté.

La mammite peut être définie selon le niveau de la réaction inflammatoire induite avec apparition de signes visibles de la pathologie (mammites cliniques) ou sans signes visibles (mammites subcliniques). Dans le cas des mammites cliniques on peut distinguer les mammites « bénignes » où seul le lait est modifié, les mammites « modérées » où le lait et l'aspect de la mamelle sont altérés, et enfin les mammites « sévères » où le lait, l'aspect de la mamelle et l'état général de l'animal sont anormaux.

On peut distinguer 2 catégories de bactéries en fonction de leur pouvoir pathogène. Certaines sont capables d'induire des mammites cliniques (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* ...) et sont classées pour cette raison parmi les pathogènes majeurs. Dans cette catégorie, il faut noter que certaines bactéries induisent plus facilement des mammites cliniques (*E. coli*, *S. uberis*) et que d'autres sont plus souvent responsables de mammites chroniques avec épisodes cliniques (*S. aureus*). A l'opposé on trouve les pathogènes mineurs qui n'induisent que rarement de mammites cliniques comme les staphylocoques à coagulase négative (CNS).

L'apparition des mammites est multifactorielle et dépend, entre autres, de l'agent pathogène responsable de l'infection (facteur déterminant) et de caractéristiques liées à l'animal (âge, stade et nombre de lactations...) et à son environnement (facteurs prédisposants). Dans l'objectif de développement de traitement curatif ou de prophylaxie, il est indispensable de pouvoir maîtriser ces facteurs afin de générer des résultats scientifiquement valides.

Ce projet vise à reproduire expérimentalement les mammites à Staphylocoque, à Streptocoque, ou colibacillaire chez la vache laitière en lactation ou au tarissement. Ce projet inclut également la mise en place de modèles de mammites en utilisant des immunostimulants comme par exemple l'endotoxine (lipopolysaccharide = LPS) ou l'acide lipotéichoïque (LTA), molécules que l'on trouve sur la membrane externe ou dans la paroi de certaines bactéries, et capables à elles seules d'induire des signes cliniques de mammite.

En effet, l'efficacité d'un traitement intramammaire doit se démontrer sur la base d'une guérison clinique (disparition des signes de l'inflammation générée par l'infection) et d'une guérison bactériologique (élimination de la bactérie infectieuse). Une mammite à LPS ou LTA s'affranchit de la source infectieuse (bactérie) et permet l'évaluation d'un effet du traitement sur les signes cliniques uniquement (ex amélioration des signes d'inflammation comme le gonflement de la mamelle, la diminution de la concentration en cellules somatiques du lait, ou l'impact sur des biomarqueurs liés à l'inflammation).

Un modèle de mammites expérimentales présente plusieurs avantages par rapport aux mammites de terrain. Lors d'une infection expérimentale de la mamelle, la dose inoculée (nombre de bactéries ou concentration de LPS/LTA) est maîtrisée et les caractéristiques de l'infection/inflammation peuvent être suivies en stade précoce.

L'espèce cible est la vache laitière en lactation ou au tarissement. Aucune méthode alternative à l'utilisation d'animaux vivants n'est susceptible de répondre aux objectifs du projet. Le projet inclura plusieurs études. Le nombre d'animaux inclus dans chaque étude sera déterminé selon sa finalité (choix du pathogène ou de l'immunostimulant, vérification de la virulence du pathogène, choix de la dose infectante/inflammatoire ...) dans le respect des textes réglementaires et lignes directrices correspondantes en vigueur et sera optimisé pour chaque nouvelle étude à partir des résultats précédents.

Les études réalisées dans le cadre de ce projet seront conduites séquentiellement afin d'obtenir les informations scientifiques nécessaires tout en minimisant le nombre d'animaux utilisés et en préservant leur bien-être autant que possible. Le nombre total d'animaux sur la durée de vie du projet n'excèdera pas 250 animaux.

Toutes les manipulations, traitements et prélèvements seront réalisés conformément aux procédures en vigueur au sein de l'UE par du personnel compétent. Depuis leur inclusion et jusqu'au dernier jour de la phase animale, les animaux seront suivis quotidiennement. Si nécessaire les animaux seront traités et sortis de la phase animale ou euthanasiés pour leur éviter toute souffrance excessive prenant en compte l'état général de l'animal et son comportement, l'état de douleur, l'appétit et la perte de poids sur la durée. Les points limites spécifiques à chaque étude seront précisés en détail dans les plans d'études. En fin de phase animale, les animaux seront traités et un suivi périodique sera effectué pour certifier de leur guérison bactériologique et/ou clinique.

Les conditions d'hébergement permettront aux animaux de répondre à leurs besoins physiologiques et comportementaux,

Les points limites seront, entre autres, toute altération inattendue du comportement propre à l'espèce ou de l'aspect de l'animal, comme une léthargie et un isolement du groupe, une perte d'appétit et de poids, une température anormale sur une période prolongée.

Toute observation laissant présager un mal-être autre que celui dû à l'infection mammaire ou un mal-être trop important dû à l'infection mammaire sera immédiatement évalué par un examen vétérinaire et traité en conséquence.

Ce projet couvre également l'acquisition et le maintien des compétences techniques par le personnel assurant l'application des procédures expérimentales aux animaux, le développement de techniques et/ou de méthodes, la validation d'équipements et/ou la génération de données historiques.

15242 Les afférences primaires transmettent les informations somatosensorielles en provenance de la peau et des tissus profonds vers la corne dorsale de la moelle épinière. Ces afférences contactent des régions spécifiques de la corne dorsale en fonction de leur modalité sensorielle : les afférences nociceptives relayant les messages nociceptifs mécaniques et thermiques se terminent dans les couches superficielles (I-II externe) tandis que celles relayant les informations tactiles non-nociceptives (Low-Threshold Mechanoreceptors, LTMRs) se terminent dans des couches plus profondes (II interne-V). Ces informations sensorielles sont alors intégrées par des circuits spinaux spécifiques et transmises aux structures suprasegmentaires via des neurones de projection. L'organisation stéréotypée des afférences sensorielles primaires dans la corne dorsale ainsi que la maturation des circuits spinaux sous-tendant la somatosensation s'effectuent au cours des premiers stades postnataux et impliquent des processus de plasticité synaptique activité-dépendante. Or la maturation des circuits de la nociception s'effectue malgré la faible occurrence d'expériences douloureuses au cours des premiers stades de la vie. Ce seraient les stimuli tactiles qui contribuent au modelage des circuits de la douleur. Par ailleurs, il est aujourd'hui admis que les symptômes douloureux de patients souffrant de douleurs chroniques sont la conséquence d'une réorganisation fonctionnelle des circuits spinaux du toucher et de la douleur. En effet, si, en conditions normales,

ces circuits sont fonctionnellement isolés l'un de l'autre, ils n'en sont pas moins reliés par des voies structurellement en place mais normalement masquées par des mécanismes d'inhibition. Cependant, dans certaines conditions pathologiques, cette inhibition est levée et les informations tactiles peuvent activer les circuits de la douleur pour induire des sensations douloureuses. Il semble donc que les circuits du toucher jouent un rôle clé dans la maturation des circuits de la nociception au cours du développement, ainsi que dans l'induction de certains symptômes douloureux. Cependant, le lien entre activité des afférences tactiles et plasticité fonctionnelle au sein de la corne dorsale, aussi bien en conditions normales que pathologiques, reste à établir précisément. De plus, il n'est pas sûr que les différents sous-types de LTMRs (A delta, A bêta et C) soient tous impliqués dans ces processus. Jusqu'à récemment, un des obstacles pour aborder ces questions résidait dans la relative faible spécificité des approches pharmacologiques et dans la difficulté à manipuler des populations précises de LTMRs. Nous proposons ici d'utiliser des modèles innovants de souris transgéniques permettant de manipuler spécifiquement des sous-types de LTMRs, soit en les éliminant soit en modulant leur activité électrique, et d'en étudier les conséquences sur i) la maturation des circuits de la nociception en conditions normales et ii) le développement de douleurs chroniques dans des modèles animaux. Ces études seront réalisées en combinant des approches immunohistologiques, électrophysiologiques et comportementales. Plus généralement, ce projet permettra de mieux connaître la mise en place des circuits spinaux de la somatosensation et leur plasticité en conditions physiopathologiques à la base des douleurs chroniques.

Pour ce projet, l'utilisation de souris transgéniques permettant de cibler spécifiquement les fibres LTMRs est nécessaire. Aucune méthode alternative n'existe pour prévenir l'utilisation de ces animaux dans ce protocole en effet, il est nécessaire de réaliser ces études chez l'animal car l'intégration du toucher et de la douleur implique de nombreux neurones organisés en réseaux complexes et méconnus du système nerveux central et périphérique. Au total, 250 souris supplémentaires seront utilisées dans ce projet (voir description du projet et annexe) L'ablation sélective des fibres LTMRs sera induite par injection intrapéritonéale de toxine diphtérique (DT). L'inhibition sélective de ces fibres se fera par injection intrapéritonéale de clozapine N-oxide (CNO). L'ablation ou l'inhibition sélective des fibres LTMRs est soumise à des variabilités interindividuelles. De ce fait, il sera nécessaire d'analyser post mortem le tissu nerveux de chacun des animaux utilisés dans ce protocole. Par conséquent, l'euthanasie de l'animal à la fin du protocole expérimental est nécessaire. Afin de respecter la règle des 3R, le nombre de souris par groupe est réduit au maximum tout en permettant de discriminer un effet significatif entre les conditions expérimentales et calculé par tests statistiques adaptés. Les groupes testés seront des animaux contrôles ou des animaux douloureux chroniques (induit par constriction nerveuse chronique ou CCI) pour induire une douleur neuropathique. Le modèle CCI mime la constriction chronique nerveuse observées chez de nombreux patients neuropathiques atteints de lésions nerveuses et qui est responsable d'une hypersensibilité dans le, et autour du, territoire lésé. Pour ce modèle de douleur, chaque animal est son propre contrôle (avant versus après induction de la douleur neuropathique) ce qui permet de réduire le nombre d'animaux utilisés tout en conservant un contrôle et une qualité suffisante à l'expérimentation. Chaque animal sera testé à l'aide d'une série de stimulations mécaniques qui contribue au respect des "R" réduire et raffiner. Nous utiliserons un nombre équivalent d'animaux mâles et femelles en respect de la règle des trois "R" et des directives sur la Recherche Animale.

Ce projet porte sur le toucher et la douleur. Par conséquent, l'utilisation d'antalgiques suite à l'induction de l'ablation des fibres LTMRs ou de l'établissement du modèle de douleur est proscrit. Cependant, en respect de la règle des trois "R", les animaux seront hébergés en milieu enrichi (social et environnemental) afin de respecter au mieux leur confort et leur niveau de stress. Aucun des modèles de douleurs décrits dans ce projet n'induit de déficit locomoteur sévère pouvant influencer sur les besoins physiologiques de l'animal. De plus, l'expérimentation sera arrêtée si l'animal montre une perte de poids supérieure à 25% suite à un traitement. Enfin, les tests comportementaux à la douleur seront réduits au minimum (fréquence et intensité des tests) et réalisés selon des protocoles expérimentaux établis et acceptés par la communauté scientifique.

15243 Le cancer du pancréas représente un problème de santé publique en occupant le deuxième rang des cancers digestifs en France. Ce cancer est très souvent diagnostiqué à un stade avancé avec un nombre de cas en constante augmentation. Il devrait être la deuxième cause de mortalité par cancer en Europe en 2030. Le traitement de ce cancer est adapté au patient (âge, antécédents médicaux, état de santé et profil de la tumeur). La chirurgie reste le plus souvent le seul traitement de ce type de cancer, si celui-ci est diagnostiqué à un stade précoce. Sinon, la chimiothérapie avec ou sans la radiothérapie est recommandée. Il a été démontré antérieurement, qu'une pression physique appliquée sur des cellules en culture pouvait en inhiber la croissance cellulaire, suggérant ainsi un rôle antitumoral d'une telle pression sur le développement d'une tumeur pancréatique. Le développement de nouveaux traitements dans un but thérapeutique représente un défi majeur pour les prochaines décennies. Le but de notre projet sera de montrer que le traitement des cancers du pancréas par application d'une contrainte physique constitue une nouvelle piste thérapeutique de ce cancer. Le but de ce travail sera de vérifier que les résultats obtenus sur cellules en culture sont transposables sur un modèle préclinique chez des souris qui présentent un système immunitaire affaibli. Notre modèle consiste à greffer des cellules cancéreuses de pancréas humain sous la peau des flancs de la souris et de suivre au cours du temps la croissance des tumeurs sous-cutanées en fonction de différentes conditions de pressions physiques induites par un champ magnétique grâce à des aimants et des particules de fer incorporées dans la tumeur.

Notre étude visera à 1) déterminer les effets antitumoraux d'une pression physique par rapport à l'absence de pression physique, et 2) déterminer les conditions optimales d'application du champ magnétique (1 heure tous les jours ou 1 heure trois fois par semaine durant 3 semaines). Ce projet se déroulera sur une période de 2 ans et nécessitera un nombre total de 60 animaux. La conformité avec les exigences de remplacement, réduction, et raffinement sera prise en compte 1) remplacement les connaissances issues de cette étude sur l'animal ne peuvent pas être obtenues actuellement par d'autres méthodes compte-tenu de la complexité physiologique de la tumeur comprenant plusieurs types cellulaires impossible à reproduire avec des lignées cellulaires, nous obligeant de travailler à l'échelle d'un organisme. Des études sur cellules en culture sont, par ailleurs, prévues pour étudier d'autres paramètres qui compléteront ce volet d'expérimentation animale sans pouvoir le remplacer 2) réduction nous avons déterminé le nombre d'animaux nécessaire et suffisant dans chaque sous-groupe pour avoir des résultats statistiquement exploitables (10 par sous-groupe) et 3) raffinement les méthodes et les mesures choisies visent à diminuer au maximum les contraintes imposées aux animaux. L'implantation en sous-cutané par injection des cellules tumorales se fera sous anesthésie générale et l'utilisation d'antalgiques sera envisagée si l'animal présente des signes de douleur au cours de l'expérimentation. Des aimants seront positionnés de part et d'autre de la tumeur sous-cutanée sur animal. La procédure d'induction du champ magnétique aux souris n'induit pas plus de douleur et de désagrément que lors d'un examen de type IRM. En effet l'intensité du champ magnétique est 10 fois plus faible que celui reçu par les animaux lors d'un examen par IRM (Imagerie par Résonance Magnétique). Au cours de la procédure, nous suivrons un groupe implanté avec les cellules tumorales qui constituera le groupe contrôle qui, développant des tumeurs sans contrainte mécanique, sera euthanasié également à la fin de l'expérience. Le traitement (contrainte mécanique) sera effectué sous anesthésie pour limiter au maximum le stress de l'animal et éviter les mouvements. Des expériences réalisées dans les mêmes conditions expérimentales d'anesthésies répétées ont été publiés en 2016 et avait reçu à l'époque l'aval d'un comité d'éthique européen (Grande Bretagne). L'expérience durera au maximum 35 jours (21 jours d'expérimentation + 14 jours de suivi post-expérimentation) selon la vitesse de croissance des tumeurs. Une surveillance quotidienne approfondie des animaux sera réalisée par les expérimentateurs tout au long des 21 jours de traitement et un suivi clinique (pesée, évaluation de l'état général, mesure des tumeurs sous-cutanées implantées) sera maintenu 3 fois par semaine durant les 2 semaines de suivi post-expérimentation. Durant toute la période d'anesthésie quotidienne des souris, une surveillance accrue post-anesthésie sera réalisée par les expérimentateurs dans une salle de réveil où les animaux seront maintenus sur un tapis chauffant au calme tout le long de la phase de réveil. Nous avons prédéfini dans nos études antérieures les différents critères de points limites (avec une grille d'évaluation) au-delà desquels l'expérience sera

stoppée par l'euthanasie de l'animal. Les prélèvements des tumeurs à analyser seront réalisés après l'euthanasie des animaux.

15244 Le cancer de la prostate est le cancer le plus fréquent chez l'homme et la seconde cause de mortalité masculine par cancer dans les pays industrialisés. Les principaux traitements sont la chirurgie, la radiothérapie et l'hormonothérapie. Cette dernière a pour but d'empêcher l'action stimulante de la testostérone sur les cellules cancéreuses. Un premier moyen d'empêcher l'action de la testostérone est de bloquer sa synthèse par les testicules. Un second moyen d'action est d'inhiber de manière compétitive la fixation de la testostérone à son récepteur par des anti-androgènes. Cependant, 10 à 20 % des patients traités par hormonothérapie développeront un cancer prostatique résistant à la castration. De plus, des études récentes ont montré un effet bénéfique de la vitamine D chez les patients atteints du cancer de la prostate. Une meilleure connaissance des mécanismes impliqués dans ces phénomènes permettrait le développement de marqueurs prédictifs de réponse au traitement et d'éventuelles alternatives thérapeutiques.

REMPACEMENT : Une stratégie de choix pour l'étude de ces mécanismes est l'utilisation de modèles murins de cancer de la prostate, subissant un traitement à la vitamine D ou une ablation des testicules. L'utilisation de modèles animaux est nécessaire pour mimer le plus fidèlement possible la maladie humaine et observer les effets sur l'organisme entier.

REDUCTION : De nombreuses études menées auparavant sur le cancer de la prostate et sur ces modèles en particulier ont mené à une bonne connaissance du modèle et de la méthodologie appropriée, permettant ainsi la mise en place d'expérimentations de qualité et raffinées sur un nombre limité de cohortes, et la réduction du nombre d'animaux utilisés au strict minimum. Ce projet sur cinq ans requiert un nombre total de 580 animaux.

RAFFINEMENT : Si certaines expériences (castration ou administration de vitamine D) ont des conséquences sur le bien-être de l'animal, des mesures seront prises (utilisation d'analgésique, complémentation de l'eau de boisson en sel, suivi du réveil et des points de suture après anesthésie...) pour éviter la souffrance de l'animal.

15245 Le noyau des cellules contient et protège le génome des cellules. Cette fonction de protection est bien connue *in vitro*, mais le rôle physiologique de la fonction protectrice du noyau est mal connu *in vivo*. Dans l'organisme, le système immunitaire joue un rôle fondamental de protection et la perturbation de l'enveloppe nucléaire entraînerait des conséquences sur le développement du système immunitaire.

Le projet décrit dans cette proposition est basé sur des observations faites en utilisant des cellules humaines dans des systèmes *in vitro* mais l'étude du système immunitaire et de ces cellules clés nécessite un système modèle dans lequel cette complexité immunitaire est représentée. Nous avons donc besoin d'utiliser un organisme plus complexe et pertinent tel que la souris. La souris est une espèce de choix pour ces expériences car la physiologie de la souris est proche de celle de l'Homme. Nous voulons étudier les conséquences immunitaires de la modulation de l'enveloppe nucléaire. Cette validation *in vivo* est essentielle pour obtenir des informations qui pourraient être traduites pour le développement de nouvelles thérapies bénéfiques pour la santé humaine. Il n'y a pas d'alternative à l'utilisation d'un modèle animal pour ce projet. Le nombre de souris est réduit pour limiter le nombre d'animaux utilisés, mais suffisamment grand pour maintenir une signification biologique qualitative. Des schémas d'élevage optimisés de lignées de souris transgéniques sont réalisés pour produire les cohortes d'animaux appropriées. Pour les 5 ans de notre étude nous aurons besoin de 224 souris. Dans un souci de raffinement, toutes les mesures seront prises pour éviter le stress et la douleur des animaux. Les expériences proposées sont nécessaires pour permettre de mieux comprendre le rôle du noyau dans la défense de l'organisme contre le cancer, les maladies infectieuses et le vieillissement.

15246 La Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO) représente la 3ème cause de mortalité dans le monde. C'est un groupe de maladies chroniques systémiques d'origine respiratoire, atteignant les bronches. Cette maladie est due à l'agression des bronches par des facteurs

environnementaux comme la fumée de cigarette ou les polluants atmosphériques. Les lésions pulmonaires associées à la pathologie sont relativement bien connues avec notamment l'emphysème pulmonaire caractérisée par la destruction de la paroi des alvéoles (site des échanges air/sang) amenant à une insuffisance respiratoire parfois mortelle.

On soupçonne que l'inflammation chronique des poumons entraîne les dysfonctionnements sur d'autres organes muscles, vaisseaux sanguins et cœur. L'atteinte cardiaque pourrait être due à de l'hypertension pulmonaire. Dans de grandes cohortes de patient, il a été mis en évidence un lien entre des problèmes cardiaques et l'étendue de l'emphysème du poumon. Les mécanismes de cette relation ne sont pas connus. Pour étudier cette pathologie, nous avons récemment développé dans le laboratoire un modèle animal rat qui mime la maladie BPCO. Durant la mise en place du modèle animal, nous avons observé des modifications de l'activité électrique du cœur et du rythme cardiaque. Le but du projet est d'étudier la relation entre l'emphysème pulmonaire et des modifications de l'activité électrique du cœur dans le modèle animal rat de BPCO que nous avons développé dans le laboratoire. L'objectif est de découvrir de nouvelles cibles responsables de la maladie pour offrir de nouveaux débouchés thérapeutiques. Une évaluation rétrospective sera effectuée suite à la mise en place du modèle.

Notre étude sera menée sur des rats de 8 semaines, selon les recommandations institutionnelles en vigueur. Un total de 90 animaux sera utilisé pour ce projet.

Des points limites seront établis dans chaque étude afin d'éviter ou limiter toute souffrance des animaux. Cette étude est un pré-requis à une future étude clinique chez l'Homme.

Nous respecterons le principe des 3 R. Si une alternative est identifiée pendant la réalisation de nos travaux, nous Remplacerons notre stratégie immédiatement. Nous réduirons le nombre d'animaux via une approche rationnelle et organisée sur le plan des protocoles (acquisition de données *in vivo* et *in vitro* menées en parallèle sur les mêmes animaux permettant d'apparier les mesures, de diminuer les groupes et d'optimiser les interprétations). Nous utiliserons de façon optimale les tissus des animaux sacrifiés. Nous réaliserons un maximum de mesures non invasives sur le même animal. Enfin, nous avons Raffiné nos approches pour réduire au strict minimum la détresse imposée à ces animaux, et pour apprécier au mieux les points limites (mise en place d'une grille d'évaluation des signes de douleurs; visites quotidiennes et soins par du personnel qualifié), en utilisant une anesthésie et analgésie pré- per- et post-opératoire afin d'éviter la génération de douleur et d'angoisse. Les animaux seront hébergés en portoir ventilé, dans le respect de la réglementation concernant les effectifs par cage, et des lanières de résineux tendre seront utilisés pour l'enrichissement. Les animaux sont stabulés sur des portoirs ventilés dans une pièce de l'animalerie agréée A1, sous contrôle permanent des températures, hygrométrie et sous un cycle de lumière (12/12h). En terme d'enrichissement, des plaques de cotons de cellulose (safe square) leur permettant de faire des nids sont ajoutés et les animaux ont des cabanes en plexiglass teinté. Les animaux ont accès à la nourriture et l'eau ad libitum. Ils font l'objet, au sein de notre animalerie, d'une surveillance quotidienne, jours de semaine et week-ends par du personnel qualifié

15247 Chez le cheval, l'acidification du contenu de l'estomac peut causer des maladies telles que les ulcères gastriques. Certains aliments permettent de limiter la baisse du pH gastrique grâce à leur pouvoir tampon intrinsèque fort. C'est le cas par exemple de la luzerne déshydratée dont les effets sur l'écosystème gastrique ont été étudiés lors d'un précédent projet (n°15644). Le présent projet vise à mener une étude *in vitro* sur l'effet de la luzerne et de deux produits contenant de la luzerne sur l'écosystème gastrique équin et de les comparer à cinq autres aliments destinés à l'alimentation du cheval. Cette étude *in vitro* permettra d'évaluer l'intérêt de la luzerne mélangée à d'autres matières premières dans l'alimentation du cheval.

Cet essai a été construit afin de répondre à la règle des 3R. En effet, il vient en remplacement d'un essai *in vivo* qui nécessiterait un nombre important de chevaux. Pour réaliser cette étude *in vitro* il est tout de même nécessaire d'utiliser des chevaux afin d'obtenir des inocula gastriques. La composition du contenu gastrique étant complexe (aliments, salive, sécrétions gastriques, micro-organismes, produits de la dégradation des aliments, etc.) il n'est actuellement pas possible de le remplacer par un contenu préparé en laboratoire. Les animaux inclus dans l'étude sont trois hongres

Trotteurs Français adultes. Dans une optique de réduction du nombre d'animaux utilisés, trois individus est un minimum pour obtenir un inoculum homogène et représentatif d'une population soumise aux mêmes conditions pour le test *in vitro*. Le prélèvement de contenu gastrique est réalisé via une sonde naso-gastrique après une période de quatre jours où les chevaux sont tous conduits de la même manière. L'intubation naso-gastrique est un geste utilisé fréquemment sur le terrain, cependant des mesures de raffinement sont mises en place. Afin de réduire une éventuelle gêne légère de courte durée au moment de l'introduction de la sonde dans le naseau, une anesthésie locale est systématiquement réalisée. De plus si l'animal présente des signes de nervosité, un tranquilisant lui est administré. En outre, la sonde utilisée présente des dimensions adaptées au cheval, son extrémité est recouverte d'huile de paraffine pour faciliter son passage, et elle est placée dans de l'eau chaude avant l'intubation pour l'assouplir et éviter de surprendre le cheval avec un matériel trop froid. Le prélèvement est arrêté en cas de saignement nasal, et la durée maximale d'intubation est de 45 minutes.

Au quotidien, des mesures sont mise en place pour respecter le bien-être des chevaux. Chaque jour ils vont au paddock en groupe et sont exercés au marcheur. Le personnel animalier observe le comportement de chaque cheval le matin au moment de la distribution du repas afin de repérer les signes de mal-être ou de souffrance. Ces signes inhabituels sont immédiatement signalés au responsable de l'expérimentation.

Les chevaux qui présenteraient des signes de mal-être ou de souffrance seront soignés et si jugé nécessaire par le vétérinaire traitant retirés de l'essai.

15248 Pour étendre les capacités d'action des services de réanimation, des ventilateurs artificiels non traditionnels mais conformes à des normes réglementaires peuvent être fabriqués en masse et rapidement par des communautés associées et coordonnées de "makers", en lien étroit avec des universités, hôpitaux et professionnels de la santé. Cette initiative française est portée par un collectif de bénévoles et son efficacité peut être fortement multipliée par un soutien logistique de l'Etat pour l'accès et le transport des matières premières et composants nécessaires, répartis sur le territoire national (en particulier dans les différents entrepôts de e-commerçants), et pour l'acheminement des ventilateurs aux hôpitaux faisant face à une situation de crise sanitaire.

Les industriels volontaires du réseau collectif ont d'ores et déjà une capacité projetée de production d'environ 500 ventilateurs robustes, peu chers à fabriquer, par jour, et sa capacité peut s'étendre par l'ajout d'autres "makers" en France. Un prototype est en cours de finalisation et de tests de confirmation d'adéquation. Une fois le modèle prototype validé, la production peut commencer immédiatement et les premiers ventilateurs livrés 10 heures plus tard pour un essai clinique ou un usage suivant l'article 3131-1 du code de la santé publique. La production se fera ensuite en flux tendu.

En préalable des séquences prévues en médecine humaine, une observation chez un animal de grande taille, un jeune porc charcutier, ventilé sur une durée de 12-24 heures est souhaitée c'est l'objet de cette procédure qui pourrait être répétée pour différents prototypes de ventilateurs, au plus cinq fois, pour un total de 10 porcs utilisés au maximum.

Les procédures de test des ventilateurs candidats seront conduites en respectant la règle des 3R

- Remplacement seuls seront conduits chez l'animal les tests fonctionnels n'ayant pas pu être menés sur un modèle de poumon artificiel.

- Réduction un à deux animaux seront mis en expérimentation pour chaque prototype de ventilateur afin de vérifier son opérabilité sur un organisme vivant avant de poursuivre l'étude par un essai clinique.

- Raffinement toutes les précautions seront prises pour assurer le bien-être des animaux mis en expérimentation de leur arrivée au laboratoire à leur départ. Ils seront maintenus en groupes sociaux dans un environnement adapté à leur espèce, leur santé sera surveillée chaque jour, les procédures seront menées sous anesthésie générale et des points limites précis seront définis afin de mettre en place des mesures adaptées leur évitant toute souffrance tout au long du projet qui ne devrait pas être contraignant pour les animaux.

15249 La pandémie de COVID-19 due à l'émergence d'un coronavirus du, le SARS-CoV-2, chez l'Homme est une menace globale pour la santé. En l'absence d'un vaccin efficace, les mesures préventives s'appuient sur le confinement et les gestes barrière. Même si ces mesures sont efficaces lorsqu'elles sont appliquées de façon stricte, elles n'ont pas pour le moment permis de bloquer la progression du virus en France. Le nombre de cas sévères et de morts continue d'augmenter ce qui met une pression exceptionnelle sur le système de santé. Il est donc urgent de trouver des solutions pour réduire l'impact clinique du COVID-19. Des traitements médicamenteux sont actuellement testés chez l'homme mais leur efficacité demeure inconnue. Ce projet vise à établir de façon urgente un modèle animal d'infection par le SARS-CoV-2 qui permettrait de tester rapidement des vaccins ou de nouvelles molécules thérapeutiques. Ce projet a également pour objectif de tester des mesures de prophylaxie qui, en stimulant la réponse immunitaire innée antivirale, pourraient limiter la transmission interindividuelle de SARS-CoV-2 ou réduire la sévérité des symptômes. Ce projet utilisera des modèles animaux furets et hamsters qui sont les espèces les plus pertinentes si l'on se base sur la proximité génétique des coronavirus responsables du SARS en 2002 et du COVID-19. Le système immunitaire de ces animaux sera stimulé par l'administration sous forme de spray intranasal de protéine de type Interferon (ou autre immunomodulateur). Ces mêmes animaux seront alors infectés avec différentes doses de SARS-CoV-2 afin d'évaluer l'efficacité du traitement.

Un nombre de 75 furets et de 414 hamsters maximum sera utilisé. L'état de santé des animaux, qui seront hébergés en cage et bénéficieront d'un enrichissement approprié, sera contrôlé quotidiennement. Tous nos résultats seront mis à la disposition du public dès que possible afin d'aider la communauté à combattre le COVID-19.

15250 D'après l'Organisation Mondiale de la Santé, le cancer est une cause majeure de décès dans le monde à l'origine de 9.6 millions de décès en 2018 ainsi que 18.1 millions de nouveaux cas.

A l'heure actuelle, de nombreux traitements ont été développés tels que la radiothérapie, la chimiothérapie, l'hormonothérapie, l'immunothérapie ou la chirurgie.

Certains de ces traitements sont très difficiles à supporter pour le patient (chirurgie mutilante, chimiothérapie lourde avec de multiples effets secondaires).

Des progrès thérapeutiques doivent encore être réalisés afin, soit de découvrir de nouvelles molécules anti-cancéreuses, soit permettre l'optimisation de molécules ou techniques déjà existantes, ou encore de développer des stratégies de chimioprévention. Tous les types de cancers peuvent être concernés par ces différentes approches thérapeutiques.

L'objectif de ce projet est de pouvoir évaluer *in vivo* l'efficacité de différentes modalités de traitements anti-cancéreux dans des modèles murins par induction chimique de tumeurs mammaires.

Afin de répondre aux objectifs de ce projet, le recours à l'expérimentation animale est nécessaire. En effet, malgré la part de plus en plus importante des modèles *in vitro* et les récents progrès en matière de modélisation *in silico*, il n'existe pas, actuellement, de méthode alternative permettant de modéliser de manière fiable l'efficacité d'un traitement anticancéreux ou de chimioprévention. L'efficacité et/ou la biodispersion d'un produit anti-cancéreux doit être évaluée dans un organisme entier vivant (modélisation d'une situation clinique).

Des critères d'interruption ou « points limites » seront définis tout au long de ce projet afin d'éviter toute souffrance. Des méthodes permettant de détecter l'apparition de ces points limites et d'essayer dans la mesure du possible de les traiter seront mises en place. Un suivi clinique quotidien des animaux sera réalisé afin de détecter tout signe anormal et ainsi prendre les mesures nécessaires le plus rapidement possible (mise en place de traitement ou mise à mort des animaux).

Un nombre maximal de 2000 rats pourra être utilisé pour ce projet, sur 5 ans qui a pour but de développer de nouveaux traitements contre le cancer du sein.

15251 Ce projet vise à réaliser une séance de Travaux Pratiques (TP) sur le développement embryonnaire d'un amphibien. Ces TP concernent des étudiants de 3ème année de Licence de Science de la Vie.

Les TP se déroulent sur 2 jours consécutifs.

Le modèle utilisé est *Xenopus laevis*, le crapaud à griffe, originaire d'Afrique australe, un amphibien anoure de la famille des pipidae. Il possède un mode de vie essentiellement aquatique, ne remontant à la surface de l'eau que pour respirer. Le mode de vie aquatique de ces animaux favorise et facilite leur hébergement en laboratoire. Le xénope se satisfait d'un simple aquarium ou d'un bac dans lequel il vit en pleine eau.

Le succès de ces amphibiens pour l'étude du développement embryonnaire dans l'enseignement supérieur tient aux dimensions importantes des œufs (entre 1 et 2 mm de diamètre), à leur développement externe qui le rend aisément accessible à l'observateur et au grand nombre d'œufs pondus comme chez le Xénope (plusieurs centaines).

De plus, les embryons peuvent être obtenus artificiellement en induisant l'ovulation puis en pratiquant la fécondation *in vitro*.

L'ovulation ne peut être obtenue qu'artificiellement avec des hormones gonadotropes du commerce. L'ovulation est induite par l'injection d'hormone gonadotrope chorionique dans les sacs lymphatiques dorsaux.

Une fois les œufs pondus, ils sont recouverts d'un broyat testiculaire obtenu après prélèvement des testicules d'un individu mâle sacrifié.

Les premiers signes de la fécondation s'observent dans les 20 minutes qui suivent l'entrée du spermatozoïde.

Le nombre total de xénope a été fixé à 10 femelles par promotion d'étudiants et par an soit un total de 50 animaux sur les 5 ans.

RAFFINEMENT : une salle dédiée au maintien des xénope a été mise en place au sein du laboratoire, et une technicienne détentrice du certificat de capacité sera affrétée pour cette espèce. Le bien-être des animaux est respecté tant pendant leur maintien au laboratoire que pendant leur manipulation.

L'état général des animaux est contrôlé quotidiennement.

L'analgésie n'est pas obligatoire chez les amphibiens. Toutefois, si nécessaire, une dose d'analgésique sera administrée avant la procédure.

En cas de comportement inadapté ou inhabituel de l'animal, une surveillance accrue sera mise en place.

Attitude face à un animal malade ou en détresse : Notre protocole en cas de maladie est l'isolement de l'animal malade. Une surveillance des animaux, particulièrement les congénères de l'individu malade. Si l'état de l'individu se dégrade alors la mise à mort de l'animal est réalisée pour éviter la souffrance de l'animal.

15252 Contexte : On entend par substances interdites par les codes des courses, les substances qui en aucun cas ne peuvent être administrées à un cheval de course, il s'agit de substances administrées le plus souvent dans le but d'améliorer les performances sportives du cheval. Ce sont, par exemple, les stéroïdes anabolisants, les substances agissant sur l'érythropoïèse : comme les stabilisateurs de facteurs induits par hypoxie (HIF) et les EPO (s), les hormones et les facteurs de croissance ainsi que les toxines peptidiques et dérivés.

La recherche des substances interdites concerne le contrôle antidopage de routine et le suivi longitudinal. Le suivi longitudinal mis en place en 2009 est relatif aux 25 meilleurs trotteurs désignés en début de chaque année par la société mère. Ces chevaux sont prélevés une fois par mois de façon inopinée en plus du contrôle antidopage habituel. Ces prélèvements du suivi longitudinal sont soumis à toutes les analyses du contrôle antidopage traditionnel ainsi que tous les nouveaux tests mis en place.

Ce projet d'expérimentation concerne le développement de méthodes adaptées à la recherche de substances interdites pour le contrôle antidopage et le suivi longitudinal. Le contrôle antidopage est basé sur des méthodes directes de détection (Recherche de la substance elle-même et de ses métabolites) et des méthodes indirectes de prises d'empreintes dites omiques les études en

transcriptomique ont pour but de quantifier la modification de l'expression des gènes marqueurs de l'administration de différentes EPO(s) et/ou hormones de croissance. Ces méthodes ont déjà été mises en place comme outil pour le suivi longitudinal. La métabolomique c'est-à-dire l'étude de l'empreinte urinaire (ou plasmatiques) de molécules du métabolisme équin a conduit à la création et l'utilisation de modèles statistiques permettant de discriminer des échantillons provenant d'animaux témoins de ceux provenant d'animaux ayant reçu des substances interdites. Deux modèles existent au laboratoire un pour le screening des hormones de croissance et l'autre celui des EPO(s). Des essais complémentaires peuvent être nécessaires afin d'étendre la capacité de ces modèles aux nouvelles molécules disponibles sur le marché. Dans le cas des études par stéroïdomique, suite à la quantification de précurseurs et de métabolites du stéroïde à étudier, l'analyse multivariée des données permet à l'aide d'un modèle statistique adapté d'optimiser leur interprétation et d'allonger la fenêtre de détection de l'anabolisant ciblé.

Ce projet d'expérimentation est indispensable afin de s'assurer que la détection des substances interdites étudiées est possible soit avec les méthodes existantes au laboratoire, soit avec les méthodes existantes modifiées, soit avec de nouvelles méthodes. Ce projet d'expérimentation doit aussi permettre d'étudier la pharmacocinétique de ces substances interdites chez le cheval afin d'optimiser leurs détections.

Protocole : Les études pilotes sur un cheval servent à montrer la faisabilité de l'étude envisagée.

Si l'étude envisagée est une étude omique, plusieurs chevaux seront nécessaires pour le protocole proprement dit. Le protocole comprend trois phases une phase de prélèvement avant administration, l'administration ou le traitement puis des prélèvements après administration. Le médicament est toujours administré par un vétérinaire et le cheval est toujours surveillé pendant le traitement. Les prélèvements sont généralement des prélèvements sanguins et urinaires. Le sang est prélevé par ponction. Les urines sont collectées après émission spontanée. Des crins peuvent aussi être prélevés dans certains cas notamment pour les études liées à la détection des anabolisants. Le nombre total d'animaux utilisés sur cinq ans est estimé à 10 et fonction du nombre de substances interdites testées sur cinq ans.

Dans ce projet, la règle des 3R a été suivie comme suit

-Remplacer cette étude ne peut être réalisée que chez l'animal vivant et sur l'espèce cible, le cheval. Des analyses *in vitro* ne sont pas toujours possibles. Dans le cas où les tests *in vitro* sont possibles, ils sont réalisés mais les résultats obtenus doivent toujours être complétés et/ou vérifiés par une étude *in vivo* dans l'espèce cible.

-Réduire le nombre d'animaux impliqués est réduit au minimum. Ces essais sont généralement conduits sur un, deux ou trois chevaux.

-Raffiner Les chevaux sont quotidiennement surveillés et observés. Tout éventuel signe d'inconfort est noté et corrigé et est pris en compte afin d'optimiser les tests ultérieurs. Le bien-être de chaque cheval est une priorité quotidienne du personnel.

15253 Le surpoids et l'obésité sont des facteurs de risque majeurs pour un certain nombre de maladies chroniques parmi lesquelles le diabète, les maladies cardio-vasculaires et le cancer. Au départ considéré comme un problème propre aux pays développés, le surpoids et l'obésité augmentent désormais de façon drastique et de manière paradoxale dans les pays où la pauvreté et la malnutrition sont très présentes. Les conséquences de l'obésité sont dues au développement d'une inflammation chronique, une réaction du système immunitaire, face à l'apport excessif de nutriments et l'accumulation de masse grasse. Le récepteur (protéine capable de se lier spécifiquement à un composé biologique et d'émettre un message) TREM-1 est capable d'amplifier l'inflammation. Il a été récemment mis en évidence à la surface des cellules principales de la masse grasse les adipocytes.

Notre hypothèse est que TREM-1 est impliqué dans le développement et la perpétuation de l'inflammation associée à l'obésité et que son inhibition permettrait de limiter les complications liées à la prise de poids.

Pour confirmer ou infirmer ces hypothèses, nous avons développé un plan expérimental en deux phases composé de 100 souris âgée de 6 à 8 semaines la première phase sera composée de 40 souris, elle nous permettra d'étudier le développement de l'obésité et ses conséquences sur des souris génétiquement modifiées n'exprimant plus le récepteur TREM-1. Les souris seront nourries pendant 12 semaines avec un régime riche en graisse. La deuxième phase contiendra 60 souris nourries ou non avec un régime riche en graisse et déficientes ou non pour la leptine, « hormone de la satiété » régulant l'appétit et contrôlant la sensation de satiété. Cette deuxième phase aura pour objectif de tester un inhibiteur pharmacologique de TREM-1 appelé LR12, ce dernier ou son peptide scramble (c'est-à-dire une molécule qui n'a aucun effet pharmacologique, afin de contrôler que la procédure d'injection n'a pas d'effet sur ce que nous souhaitons observer) seront injectés de manière journalière à partir de la 8ème semaine de régime pendant 4 semaines (procédure 2).

L'ensemble des souris (n=100) seront soumises à un suivi de leur consommation de nourriture et de l'évolution de leur poids de manière hebdomadaire (procédure 1). Des tests de tolérance au glucose (procédure 3) et de résistance à l'insuline (procédure 4) seront réalisés sur n=50 souris chacun. Nous effectuerons un suivi échographique (procédure 5) pour étudier l'évolution de la fonction cardiaque et nous prélèverons du sang par ponction intracardiaque en fin d'expérience (procédure 6).

En fin d'expérience, les organes seront prélevés et analysés par différentes méthodes pour déterminer le degré de sévérité des conséquences liées à l'obésité (Conséquences hépatiques, rénales, cardiovasculaires).

Notre projet est en accord avec la règle des 3R

-Remplacer Afin de limiter le recours à l'expérimentation animale des études préliminaires ont été réalisées sur des modèles de culture cellulaires (Humains) et des résultats prometteurs ont été obtenus. Cependant, nous ne pouvons pas remplacer les modèles murins par des modèles *in silico* (recherches informatisées) ou *in vitro* (recherches sur cellules ou tissus) car nous souhaitons nous rapprocher des conditions cliniques afin d'appréhender les éventuelles modifications des mécanismes pathologiques associés à l'obésité (prise de poids, diabètes).

-Réduire Nous nous limitons aux seules expériences indispensables, le nombre de souris a été déterminé en fonction des études bibliographiques cardiovasculaires et réduit au minimum tout en conservant la faisabilité du projet. De plus, notre approche de l'obésité et de ses conséquences n'a jamais été réalisée, il n'existe aucune donnée bibliographique concernant l'implication de TREM-1 dans l'obésité.

-Raffiner Les procédures ont été optimisées afin de réduire l'inconfort de l'animal et obtenir un maximum d'informations. Chaque souris sera observée quotidiennement, ce qui nous permettra de déceler les signes de mal-être. Pour les procédures pouvant engendrer une souffrance des mesures de raffinement tel que l'anesthésie générale ou l'anesthésie locale seront mises en place. Les animaux seront hébergés à 5 dans des cages ventilées et filtrées de 500 cm². Nous veillerons à l'enrichissement du milieu de vie (tunnels, bûchette en peuplier, matériel de nidification...). Nous avons fixé des points limites suffisamment précoces et compatibles avec les objectifs scientifiques de l'étude arrêt ou diminution significative de la prise alimentaire et de boisson, démarche anormale, absence de toilettage, gonflement anormal au niveau des sites d'injection, traces de griffures, toute anomalie du comportement telles que prostration.

15254 Hippocrate, Avicenne et la médecine traditionnelle chinoise considéraient l'odeur comme une source de diagnostic et le changement d'odeurs comme le témoin d'une pathologie. Plusieurs travaux scientifiques récents ont confirmé que bon nombre de pathologies s'accompagnent en effet de modifications d'odeurs corporelles. Les cancers, seconde cause de décès à travers le monde et première cause de décès prématuré avant 65 ans en France, n'échappent pas à la règle. La littérature fait déjà état de modifications d'odeurs corporelles associés au cancer. Cependant, de nombreuses questions restent en suspens, tant sur les causes que sur les conséquences de ce phénomène, ainsi que sur sa possible utilisation pour la détection des cancers. A quel moment observe-t-on un changement d'odeur ? Ces modifications d'odeurs peuvent-elles être détectées par

des congénères ? induisent-elles une modification du comportement chez les congénères ? notamment sur les préférences sociales et sexuelles ? Ce projet vise donc à caractériser les changements d'odeurs survenant au cours du développement de tumeurs pulmonaires chez un modèle murin, et à étudier le comportement des souris femelles et mâles vis-à-vis d'odeurs de souris mâles cancéreux à différents stades de développement du cancer et tester leur impact sur le choix du partenaire sexuel. Pour ce faire, nous aurons recours au modèle animal de type murin. Nous réaliserons des tests d'habituation/discrimination à des sources d'odeurs (de la litière souillée) pour déterminer à quel stade de développement du cancer les souris sont capables de détecter un individu cancéreux. Pour cela nous utiliserons 21 souris domestique mâles, de lignée sauvage nées en laboratoire. Pour savoir si ces changements d'odeur peuvent modifier les préférences sexuelles des congénères nous réaliserons des tests de préférence avec un dispositif en Y avec 21 souris domestiques femelles de lignées sauvages nées en laboratoire. Les stimuli présentés aux souris seront soit de la litière souillée prélevée dans la cage de souris cancéreuses soit leur urine. Ces stimuli ont été obtenus lors d'une précédente étude ayant fait l'objet d'une autorisation du comité d'éthique. Pour le bien-être des individus, les cages d'hébergement sont enrichies d'objets en carton et en plastique (igloos) leur permettant de s'abriter et du matériel leur permettant de construire leur nid : carton et foin en plus de la sciure. Une roue sera également disponible dans chaque cage augmentant la variété de mouvements possible. En supplément de l'alimentation de laboratoire, des graines de tournesols non décausés seront disponibles. Les souris seront maintenues en couple jusqu'à 2 semaines avant les expérimentations puis seront isolées. Nous serons vigilants à tout signe de stress ou agressivité lors du maintien en couple, et le cas échéant les souris seront séparées. Les tests comportementaux seront réalisés à l'âge adulte (~3mois) et se dérouleront sur une période de 7 semaines pendant lesquelles chaque souris sera testée 1 fois /semaine à raison de 30 min maximum de manipulation. Ces tests sont des tests réalisés en routine et ne déclenchent pas de stress particulier chez les souris. Nous avons limité le nombre de souris testée au minimum nécessaire pour obtenir une puissance statistique acceptable (21 mâles et 21 femelles). À ce jour le remplacement du modèle animal pour ce type d'étude n'est pas envisageable.

15255 L'objectif de cette étude est de caractériser l'implication dans les douleurs physiologiques, inflammatoires et neuropathiques d'un gène dont la fonction est inconnue à ce jour. Ce gène a été identifié par un criblage fonctionnel réalisé *in vitro* dans un programme de recherche combinant analyse transcriptomique et enregistrements électrophysiologiques. Des expériences sur des neurones sensoriels isolés de souris ont permis de mettre en évidence son implication dans la réponse mécanique de ces cellules, suggérant son implication dans le système somesthésique et notamment dans la mécano-nociception, i.e. la perception de la douleur d'origine mécanique. La sensibilité douloureuse ne pouvant s'évaluer in fine que sur des animaux vivants, l'expérimentation sur l'animal vivant s'inscrit dans la continuité de nos expériences et des résultats que nous avons obtenus *in vitro*.

Nous utiliserons donc des souris génétiquement modifiées pour lesquelles ce gène est inactivé et testerons leurs réponses comportementales à des tests de douleur dans des conditions normales, inflammatoires et dans un modèle de douleur neuropathique. Les résultats seront comparés avec ceux de souris sauvages de la même lignée. L'optimisation des procédures prévues (une même souris suivra plusieurs tests comportementaux à la suite) nous permet de réduire le nombre d'animaux utilisés dans le cadre de cette étude.

Pour réaliser ce projet, 192 souris seront utilisées afin de pouvoir comparer les conditions testées et d'observer des différences significatives sur les paramètres étudiés avec un risque alpha fixé à 0.05.

Le choix du modèle murin pour ce projet est justifié par le fait que le gène d'intérêt a été identifié *in vitro* chez la souris et que la souris transgénique KO pour ce gène existe. La règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer) sera respectée Réduction du nombre d'animaux sans mettre en péril une interprétation statistique des résultats. Une définition précise des points limites et une surveillance adaptée des animaux permettra d'éviter la souffrance des animaux. Ils permettront de définir la nécessité d'un traitement symptomatique (analgésique, modification du protocole expérimental).

Les expériences de comportement ont été choisies afin de limiter au maximum la contention de l'animal (animal libre de ses mouvements), et l'environnement des animaux sera enrichi avec des dômes en carton. Lors de la réalisation des protocoles, le maximum d'informations sera récolté afin de restreindre l'utilisation de l'animal.

Cette étude pourrait être à l'origine du développement de traitement ciblant les douleurs qui interviennent dans de multiples maladies et syndromes chroniques ou inflammatoires, telles que la polyarthrite rhumatoïde ou l'arthrose qui touche 10 millions de français.

15256 Chez l'homme, la douleur neuropathique est très hétérogène : elle reflète des signes et des symptômes différents dues à des pathologies très diverses. Des douleurs peuvent survenir à la suite de lésion secondaire (diabète, effet secondaire de la chimiothérapie) ou traumatiques (sections d'un nerf). Ces douleurs se traduisent majoritairement par une allodynie (douleur induite par un stimulus normalement non douloureux) induite par le froid ou le toucher. Sur le plan pharmacologique, la douleur neuropathique répond mal aux antalgiques classiques (Gapabentine et Morphine) d'où le besoin de mise au point de nouvelles molécules.

Le but de ce projet, est de fournir des résultats scientifiques, générés dans le respect systématique des normes éthiques les plus élevées, sur l'intérêt de molécules antalgiques destinées au traitement d'une douleur liée à une neuropathie chimioinduite.

Nos activités s'inscrivent dans le respect de la règle des « 3R » pour l'expérimentation animale. Notre activité permet de Raffiner en proposant des modèles *in vivo* toujours plus proches des situations cliniques (induction de pathologies, mesures des composantes multiples de la douleur). Le Raffinement passe également par la réduction autant que possible de la souffrance et du stress des animaux et par l'amélioration de leur bien-être (enrichissement et paramètres environnementaux contrôlés tout au long de l'étude, mise en place de points limites). Bien que le concept de méthodes alternatives soit étroitement lié à la règle des « 3 R », en particulier aux alternatives de remplacement, nous comprenons « méthodes alternatives » également en termes de raffinement des modèles animaux nouveaux ou existants déjà.

Enfin, pour chaque étude, le nombre d'animaux utilisés est Réduit à un minimum acceptable pour l'obtention d'informations robustes et statistiquement pertinentes. Le nombre d'animaux (rats) utilisés pour cela est estimé à 600 sur un an répartis dans les 2 procédures (400 animaux par an pour la procédure 1 et 200 animaux par an pour la procédure 2) et cela répété sur 4 ans (2400 animaux au total).

15257 Contexte : Ce projet d'expérimentation s'inscrit dans le cadre des études pharmacocinétique/pharmacodynamique pour des traitements par voie intra-articulaire notamment les corticostéroïdes. La Triamcinolone Acétonide (TA) est, à notre connaissance, un des corticostéroïdes les plus utilisés en thérapeutique vétérinaire. D'autres corticostéroïdes sont également administrés par voie intra articulaire, C'est le cas notamment de la béthaméthasone, de la méthyl prednisolone, et de la fluméthasone. Le but de ce projet est soit de vérifier le temps de détection, soit de déterminer une limite de screening (dans les milieux de contrôle anti-dopage urine et plasma) pour le contrôle d'une substance donnée administrée par voie intra-articulaire. La détermination des limites de screening est réalisée dans un contexte d'harmonisation du contrôle antidopage en Europe via l'EHSCL (European Horserace Scientific Liaison Committee). Ces recherches ont été initiées il y a plusieurs années, afin d'éviter de rapporter des cas positifs correspondant à des administrations très anciennes où la substance retrouvée dans l'urine ou le plasma ne reflète que l'exposition du cheval à ladite substance et non son effet. Il a été établi un modèle afin de déterminer de façon rationnelle ces limites. Dans le cas des médications administrées par voie intra-articulaire si aucune donnée n'est disponible, il est impératif de pouvoir déterminer la concentration dans le liquide synovial au temps supposé être la limite entre l'effet (effet de la molécule administrée au niveau de l'articulation) et l'exposition (c'est à dire l'absence d'effet mais la persistance de la présence de la molécule dans les liquides biologiques sang et urine). La concentration déterminée dans le liquide intra-articulaire sera comparée à la concentration locale efficace pour ce produit donnée par la littérature. Pour une substance donnée,

dans le cas, où une limite de screening a déjà été déterminée, il peut être nécessaire de vérifier le temps de détection.

L'administration d'une substance thérapeutique à un cheval d'expérimentation est indispensable mais l'expérimentation est entreprise uniquement si les données bibliographiques sont insuffisantes ou inexistantes.

Ces études sont menées sur un seul cheval (étude pilote) puis ensuite sur 6 chevaux conformément au protocole de l'EHSCL si cela est nécessaire.

Le nombre total de chevaux potentiellement utilisés sur 5 ans est de 8, du fait de la possible ré-utilisation des chevaux présents dans l'établissement.

Protocole :: Le protocole comprend trois phases : une phase de prélèvements avant administration (comprenant un prélèvement de sang, d'urine et si nécessaire de liquide synovial), l'administration par voie intra-articulaire puis des prélèvements après administration (sang, urine et liquide synovial). Le médicament est toujours administré par un vétérinaire et le cheval est toujours surveillé pendant le traitement. Des chevaux calmes sont choisis pour ce protocole. Si besoin, le cheval est tranquilisé avec une médication appropriée avant l'administration par voie intra-articulaire. Les prélèvements collectés après administration sont des prélèvements sanguins, urinaires avec au moins un prélèvement de liquide synovial si besoin. Le sang est prélevé par ponction. Les urines sont collectées après émission spontanée. Le liquide synovial est prélevé en suivant le protocole approprié.

Dans ce projet, la règle des 3R a été suivie comme suit

-Remplacer cette étude ne peut être réalisée que chez l'animal vivant et sur l'espèce cible, le cheval. Des analyses *in vitro* ne sont pas toujours possibles. Dans le cas où les tests *in vitro* sont possibles, ils sont réalisés mais les résultats obtenus doivent toujours être complétés et/ou vérifiés par une étude *in vivo* dans l'espèce cible.

-Réduire le nombre d'animaux impliqués est réduit au minimum. Ces essais sont généralement conduits sur un à huit chevaux.

-Raffiner Les chevaux sont quotidiennement surveillés et observés. Tout éventuel signe d'inconfort est noté et corrigé et est pris en compte afin d'optimiser les tests ultérieurs. Le bien-être de chaque cheval est une priorité quotidienne du personnel.

15258 Nos travaux de recherche visent à étudier et caractériser le rôle d'une signalisation de stress intracellulaire dans le maintien des fonctions physiologiques et leurs dérégulations. Cette signalisation intracellulaire appelée p-eIF2a/ATF4 peut être déclenchée en réponse à différents stimuli par le biais de 4 protéines kinases différentes (GCN2, general control non-derepressible-2 PERK, PKR-like ER kinase PKR, protein kinase double-stranded RNA-dependent HRI, heme-regulated inhibitor) et aboutit notamment à un programme d'expression génique spécifique impliqué dans l'adaptation au stress. Nous étudions plus particulièrement la protéine kinase GCN2 qui est activée principalement par les ARN de transfert non-chargés, dont la concentration intracellulaire augmente fortement lors de déficits en acides aminés indispensables (non-synthétisés par l'organisme et devant être apportés par l'alimentation). Dans la littérature, GCN2 a récemment été impliquée dans différentes fonctions de l'organisme en situation physiologique, physiopathologique ou pathologique. Nos travaux ont notamment montré que la voie de signalisation GCN2/p-eIF2a/ATF4 joue un rôle important dans la régulation du processus autophagique. Globalement, ces données montrent que GCN2 est un acteur important de la gestion du stress cellulaire et de la lutte contre la survenue de dérèglements initiateurs de différentes pathologies. Dans ce projet, nos recherches visent à caractériser le rôle de la voie de signalisation GCN2/p-eIF2a/ATF4 dans la régulation de l'autophagie et l'homéostasie mitochondriale au niveau de différents organes (foie, cœur, cerveau, muscle squelettique...).

Une grande partie des expérimentations de ce projet est réalisée *in vitro* sur cultures de cellules. Elle permet de décortiquer certains mécanismes moléculaires dans un modèle simple permettant d'accéder à différents modèles génétiquement modifiés (cellules invalidées pour GCN2 ou ATF4 notamment). Les réponses intégrées des différents organes ne pouvant pas être anticipées à partir

des données générées *in vitro*, les expérimentations sur animal sont indispensables pour remplir nos objectifs. Nous avons choisi comme modèle la souris C57BL/6J pour les raisons suivantes la disponibilité des modèles génétiquement modifiés (souris invalidées pour GCN2 notamment), la disponibilité des outils moléculaires, le temps de génération réduit et la bonne connaissance du métabolisme. Ce projet comporte l'utilisation de plusieurs lignées de souris transgéniques. Le nombre total d'animaux utilisés devrait avoisiner 1600 souris au total sur une durée de 5 ans. Les conditions d'élevage et les mises en œuvre des procédures sont optimisées de manière à réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'angoisse subie par les animaux. Ce projet a donc été conçu pour respecter au mieux la « règle des 3R, Réduire, Raffiner, Remplacer ».

15259 L'apparition de résistance aux traitements antibiotiques de référence rend urgente la découverte de nouvelles solutions thérapeutiques innovantes. Les infections nosocomiales en milieu hospitalier représentent plus de 7 millions de cas par an entraînant plus de 300 000 décès (données Europe/US). Les infections bactériennes entraînent 3 millions de cas nécessitant une hospitalisation. De plus le segment des maisons de santé/retraite est en forte progression compte tenu du vieillissement de la population.

Aussi, dans l'approche des traitements des maladies infectieuses, le développement de modèles de pharmacologie *in vivo* demeure indispensable, notre objectif étant de fournir des produits innovants et des solutions de santé adaptées pour combattre la menace grandissante des infections multi-résistantes. En effet les tests *in vitro*, effectués préalablement pour valider l'intérêt de la cible, ne permettent pas d'appréhender les mécanismes d'action de l'infection et les interactions hôte (le patient) / pathogènes (bactéries).

La diversité des micro-organismes concernés et les sites d'infection potentiels nécessitent le développement de différents modèles animaux pour simuler des pathologies tels que la septicémie, la pneumonie, les infections tissulaires.

Les mécanismes d'action liés au système immunitaire de l'hôte peuvent conduire au recours à des modèles de rongeurs (souris) immunodéprimés ou immunocompétents. La caractérisation de certaines cibles cellulaires impliquées dans l'immunité peut également entraîner l'utilisation de souris transgéniques.

Le nombre d'animaux utilisés dans ce cadre représente au maximum 16250 souris pour 5 ans avec des modèles de classe modérée ou sévère de courte durée (24h à 7 jours selon le modèle). Une observation quotidienne est réalisée à minima pour tous les modèles, la fréquence de cette observation peut être augmentée selon la durée et la sévérité du modèle.

Mise en œuvre des 3R

Remplacement : Aucune méthode évitant totalement le recours à l'animal selon les exigences réglementaires des pays destinataires des produits n'est développée à ce jour pour les procédures expérimentales décrites.

Réduction : Le schéma expérimental des tests de ce projet a fait l'objet d'une revue par des biostatisticiens afin de calculer au plus juste le nombre d'animaux à utiliser tout en permettant un support au dossier réglementaire CTD (Common Technical Document).

Raffinement : Les animaux sont hébergés en groupe dans des cages contenant des dispositifs d'enrichissement dans des locaux appropriés, conformes aux standards réglementaires et suivis par un personnel spécifiquement formé. A chaque fois que cela est possible, des points limites sont mis en place dans les études pour limiter la souffrance des rongeurs.

15260 L'accident ischémique transitoire (AIT) est une forme d'accident vasculaire cérébral (AVC) fréquent dont la prévalence augmente fortement avec l'âge. Dans les pays occidentaux, on peut estimer l'incidence annuelle moyenne des AIT à environ 35/100 000 avec une prépondérance masculine. L'AIT est défini classiquement comme un épisode bref de dysfonction neurologique dont les symptômes cliniques régressent totalement en moins de 24 heures et ce, sans preuve d'infarctus cérébral aigu en imagerie. Cet accident transitoire résulte de l'interruption de la circulation sanguine

dans une région cérébrale, généralement lorsque le vaisseau sanguin se rompt ou lorsque celui-ci est occlus par un caillot.

Traditionnellement, de nombreux professionnels de santé ont considéré que l'AIT était un événement bénin au vu de la résorption rapide des symptômes et ce, sans intervention médicale. Or, de récentes études cliniques ont rapporté l'existence de graves séquelles cognitives et / ou émotionnelles persistant sur le long terme chez les patients AIT. Ces troubles cognitifs ont été décrits comme portant sur des fonctions exécutives, attentionnelles mais aussi sur certaines fonctions mnésiques. Par ailleurs, l'occurrence de troubles émotionnels a été observée à plusieurs reprises au sein de cette population. On note en particulier une forte prévalence de symptômes dépressifs, une anxiété pathologique et parfois un syndrome de stress post-traumatique après l'accident vasculaire, soulignant l'impact retentissant de l'AIT sur la vie des patients.

Il semble aujourd'hui crucial de remettre en question la définition de l'AIT, i.e. la seule présence de symptômes focaux, et de considérer l'existence de déficits cognitifs et émotionnels résiduels. En d'autres termes, l'AIT ne serait pas un événement transitoire mais une maladie chronique invalidante qu'il conviendrait de traiter en conséquence.

L'objectif de ce projet est donc de caractériser ces atteintes fonctionnelles dans un modèle d'AIT chez le rongeur afin d'étudier les mécanismes physiopathologiques sous-jacents et, ultérieurement, de mettre en évidence des cibles thérapeutiques innovantes pour enrayer ces déficits.

Cette étude basée sur l'expérimentation animale prend en compte le bien-être animal et les pratiques éthiques, et répond à la règle des 3 R (remplacer, réduire, raffiner)

La souris est l'espèce animale la plus étudiée dans le domaine de l'accident vasculaire cérébral. L'anatomie et la physiologie de la circulation cérébrale sont parfaitement connues, ce qui rend cette espèce particulièrement intéressante pour étudier l'accident ischémique transitoire. Notre projet ne nous permet pas d'utiliser d'autres moyens que les tests comportementaux largement décrits dans la littérature pour quantifier les déficits fonctionnels chroniques. Les données de la littérature relatant, entre autres, la forte variabilité interindividuelle liées aux études comportementales et après consultation d'un biostatisticien, le nombre minimal d'animaux utilisés dans ce projet est de 690. Concernant le raffinement des conditions expérimentales, l'état de chaque souris sera contrôlé quotidiennement afin de s'assurer de son bien-être. L'animal sera immédiatement soigné s'il présente des blessures légères. En revanche si un animal montrait des signes cliniques de souffrance (perte de $\geq 15\%$ du poids initial, apathie...), celui-ci serait immédiatement retiré du protocole (selon les points limites décrits dans le projet).

15261 Le projet vise à estimer l'efficacité pour les poissons de la connectivité actuelle d'un grand axe fluvial, sur un secteur de 185km comptant sept barrages qui ont tous été progressivement équipés ces dernières années de dispositif(s) de franchissement piscicole. Ces dispositifs n'ont fait l'objet d'aucun suivi d'efficacité et seules deux stations de vidéo contrôle des migrations (STACOMI) fournissent actuellement des données quantitatives de passage des poissons. L'expérimentation vise à détecter plus finement par pistage acoustique l'étendue des déplacements et flux migratoires d'espèces migratrices et d'espèces strictement d'eau douce (holobiotiques). Il s'agira d'évaluer la fréquentation des habitats par ces espèces, leur propension à se déplacer (migrations latérale et longitudinale) et à poursuivre leur progression sur l'axe et ses affluents jusqu'aux frayères potentiellement accessibles pour elles. Ces observations permettront d'estimer la connectivité octroyée par les dispositifs de franchissement existants et l'impact cumulé des obstacles physiques sur l'accessibilité aux habitats fonctionnels, pour mettre en évidence les zones potentiellement à préserver et à restaurer afin de rétablir les fonctionnalités du bassin-versant pour les espèces étudiées et faciliter la réalisation de leur cycle de vie.

Les espèces sont des migrateurs (saumon atlantique, truite de mer, grande alose, anguille européenne, lamproie marine, mulot porc) et des holobiotiques (barbeau fluviatile, brème commune) inscrits dans les plans de gestion régionaux et choisis selon leurs potentialités de reconquête du bassin-versant. L'effectif total est de 120 poissons sur un an de suivi, soit 20 individus

par espèce sauf pour les salmonidés plus rares à l'amont du bassin (10 saumons, 10 truites de mer) et les holobiotiques (20 barbeaux de grande taille ou 10 barbeaux, 10 brèmes).

Les poissons seront capturés au verveux (filet conique) par un pêcheur professionnel dans le bassin de sortie de la passe à poissons du premier barrage aval. Trois à 4 campagnes hebdomadaires de piégeages quotidiens sont prévues entre avril et juillet, calées sur les rythmes de passages au barrage et la STACOMI (en temps réel ou différé) aidera aussi à ajuster la fréquence de relevé (~toutes les 2h) à l'abondance des remontées.

A chaque piégeage, les poissons seront triés, sélectionnés et répartis dans des bacs couverts de grande capacité constamment alimentés en eau de rivière fraîche et bien oxygénée (circuit ouvert) ceux pêchés à l'amont seront transportés par bateau (bac, eau aérée) en moins d'1h et seront à leur arrivée hébergés à part dans des conditions similaires. Tous seront gardés 2 à 3h (maximum 10-12h) dans l'attente du marquage et seront observés régulièrement.

Chaque poisson sera anesthésié par baignade dans une solution adaptée aérée en continu (dose variable selon l'espèce et le marquage). Il sera pesé, mesuré et identifié par une marque externe dorsale. Un prélèvement d'écaillés sera effectué pour déterminer l'âge (analyse de croissance des populations) et chez le saumon et l'aloise, un morceau de nageoire sera aussi prélevé pour déterminer leur origine (analyse génétique populationnelle). L'animal sera ensuite marqué avec un émetteur acoustique par insertion dans la cavité stomacale par voie naturelle (aloise, salmonidés) ou dans la cavité abdominale par chirurgie (autres espèces). Puis l'animal sera placé en réveil dans une cage flottante de pleine eau (aloise, salmonidés) ou un grand bac couvert en circuit ouvert jusqu'à récupération complète de l'anesthésie. Il sera gardé 1h minimum en observation (12h maximum) avant d'être libéré.

Les poissons seront suivis pendant un an pour couvrir la migration de reproduction (6 mois pour l'anguille prélevée au stade jaune). Le secteur d'étude sera maillé par un réseau de 65 hydrophones déployés à des endroits stratégiques 30 sur les 40 premiers km (déplacements des holobiotiques et anguilles) et 35 en barrières d'écoute à l'aval et à l'amont des barrages et des principales annexes hydrauliques et aux confluences des principaux affluents (migrations).

Il est nécessaire de recourir à des animaux sauvages car il n'existe pas d'élevage pour les espèces visées excepté pour le saumon. Comme la réponse comportementale de saumons de pisciculture vis-à-vis de la fragmentation du milieu risque d'être mal-adaptée par rapport à une population naturelle, les 120 poissons utilisés seront tous capturés dans leur milieu pour évaluer l'impact cumulé des barrages sur l'accessibilité aux habitats fonctionnels.

L'échantillonnage reste représentatif du peuplement piscicole observé. L'effectif spécifique ne représente qu'un très faible pourcentage chez la plupart des espèces et est adapté chez les salmonidés (ou barbeaux) à la disponibilité en individus. C'est un minimum raisonnable sur un an pour une approche à l'échelle du bassin-versant et nécessaire statistiquement pour documenter la variabilité comportementale intra et interspécifique et la corrélérer à quelques variables environnementales.

Raffinement le piégeage est optimisé pour cibler les espèces et maximiser la capturabilité, tout en limitant les traumatismes physiques, sources de stress (temps d'attente, densité dans le piège) et effets sur les populations. Les conditions d'hébergement sont adaptées (pleine eau ou renouvellement par circuit ouvert, faible densité, abris artificiels selon l'espèce) et limitées au minimum nécessaire pour ne pas affecter la physiologie, la santé ou le comportement habituel de l'animal. Les poissons seront observés régulièrement et la physico-chimie de l'eau surveillée. Les marquages, standardisés et déjà pratiqués, tiennent compte des spécificités et de la fragilité des espèces. L'insertion gastrique, peu traumatisante et adaptée aux espèces qui stoppent leur alimentation en migration de reproduction, sera pratiquée sous anesthésie légère et sans émergence de l'animal. Chez les autres espèces, le marquage abdominal sera opéré sous anesthésie profonde après injection d'un analgésique pour soulager la douleur et d'un antibiotique pour prévenir l'infection post-chirurgicale et faciliter la cicatrisation. Ces mesures (et le faible poids de la marque) limiteront les effets préjudiciables à la survie et aux performances de nage des animaux.

15262 Ce projet a pour but d'évaluer l'activité tumorigène (multiplication des cellules tumorales) des interleukines de la famille IL-17 (protéines messagères et régulatrices du système immunitaire naturellement présentes dans chaque organisme) dans les mélanomes, les fibrosarcomes, et les cancers mammaires, colorectaux, pancréatiques et du col de l'utérus. Les interleukines sont des cytokines autrement dit des facteurs solubles présents dans chaque organisme. Elles servent de messagers entre les cellules du système immunitaire. L'objectif de ce projet est d'analyser chez la souris l'impact du blocage de l'IL-17B et son possible effet synergique avec l'inhibition d'IL-17A sur le développement de la tumeur de la chimiorésistance et de valider ainsi l'utilisation des anticorps anti-IL-17 comme candidats pour l'immunothérapie anti-tumorale par neutralisation de ces cytokines. Dans ce projet, quatre approches complémentaires sont utilisées pour évaluer l'inhibition de la voie IL-17 sur la croissance tumorale et la mobilisation de la réponse immunitaire anti-tumorale et la chimiorésistance. La progression tumorale est évaluée en comparant les valeurs de volume tumoral au cours du temps. Les souris sont surveillées quotidiennement, ceci dans le but de

-suivre le développement de la tumeur, celle-ci ne devant pas excéder 1500 mm³ de volume ou 17 mm de diamètre,

-détecter le moindre signe de souffrance et/ou de détresse de l'animal (exigence de raffinement).

Au maximum 5880 souris peuvent être utilisées. Le nombre d'animaux est réduit au minimum tout en ayant un nombre suffisant pour obtenir un résultat statistiquement significatif (exigence de réduction). On anticipe cependant que le nombre total de souris utilisées peut être inférieur au nombre total annoncé, car selon les résultats des premières études, l'utilisation de certaines lignées cellulaires ne sera pas poursuivie. Il est cependant difficile à ce stade de déterminer quelles lignées seront conservées.

Ces études découlent de premiers résultats *in vitro* et *in vivo* non publiés et réalisés au sein du laboratoire. Les effectifs donnés dans ce projet ont été évalués par les biostatisticiens de notre laboratoire et les résultats de ce projet seront analysés par cette équipe afin de déterminer la significativité.

Toutes les expériences sont menées par du personnel formé et compétent. De plus le contenu de celles-ci intègre les impératifs éthiques, la mise en place de points limites, les modalités d'hébergement, d'enrichissement du milieu, de prévention de toute douleur, détresse, et/ou inconfort chez l'animal.

15263 Ce projet vise à développer une stratégie de lutte vis-à-vis de la bactérie *Campylobacter jejuni* dans la filière avicole par vaccination.

L'infection à *Campylobacter* est l'infection bactérienne d'origine animale la plus fréquemment rencontrée chez l'homme avec plus de 246 000 cas annuels en Europe. Causant des gastroentérites, l'infection est généralement bénigne mais peut être plus grave chez les très jeunes enfants, les personnes âgées ou immunodéprimées. Elle a des répercussions importantes en santé publique et au plan économique. L'une des sources principales de contamination en est la viande de poulet. En effet, cette bactérie infecte naturellement le poulet sans le rendre malade.

Réduire la présence de *Campylobacter* chez les poulets de chair avant l'abattage, en particulier par l'usage de vaccins, permettrait de réduire drastiquement le risque d'infection humaine, voire de le supprimer. Récemment, certains vaccins destinés aux poulets de chair ont été identifiés mais leur efficacité mérite d'être améliorée, ce qui nécessite une meilleure connaissance des mécanismes de protection vaccinale contre *Campylobacter*.

Dans ce projet, nous allons nous baser sur l'observation suivante pour rechercher les paramètres clés de la protection vaccinale un des vaccins à notre disposition a permis d'éliminer l'infection par *Campylobacter* chez des poules pondeuses de race Leghorn, alors que le même vaccin s'est révélé totalement inefficace à réduire (même très partiellement) la quantité de *Campylobacter* chez des poulets de chair, ceux pour lesquels un vaccin est nécessaire. Un mécanisme de défense contre *Campylobacter* s'est donc développé suite à la vaccination chez ces poules Leghorn mais pas chez les poulets de chair. Identifier les mécanismes de défense contre *Campylobacter* chez les poules Leghorn suite à la vaccination devrait permettre de dégager de nouvelles pistes d'amélioration de

la vaccination chez les poulets de chair. Pour cela, les réponses immunitaires induites par le vaccin seront comparées entre poulets Leghorn (protégés lors de l'essai précédent) et poulets de chair (non protégés lors du même essai) afin de rechercher les paramètres clés expliquant cette différence de réponse et potentiellement utilisables pour l'amélioration des vaccins destinés aux poulets de chair.

Les essais seront réalisés selon une seule procédure expérimentale menée dans le respect de la règle des 3R réduction du nombre d'animaux utilisés au seuil de la pertinence scientifique et statistique (150 au total, répartis en 4 groupes - Leghorn ou poulets de chairs vaccinés ou non vaccinés). Le raffinement des conditions d'hébergement visera à assurer des conditions d'hébergement limitant l'inconfort potentiel des animaux (eau et nourriture à volonté, lampes chauffantes). En ce qui concerne le remplacement, en l'absence de lignée cellulaire pouvant mimer le système immunitaire aviaire, aucune stratégie alternative visant à évaluer l'immunogénicité d'un vaccin inoculé aux poulets n'est disponible.

15264 L'imatinib et la neoBOMB1 ont toutes deux démontré une efficacité pour la thérapie des tumeurs gastro-intestinales. L'imatinib, est un inhibiteur de tyrosine-kinases dont la tyrosine-protein kinase kit qui est fréquemment surexprimée dans les tumeurs gastro-intestinales. La neoBOMB1 est quant à elle spécifique du récepteur à la GRP (pour Gastrin Releasing Peptid) qui a été identifiée comme étant exprimée dans plusieurs types de cancers dont les tumeurs stromales gastrointestinales.

L'objectif de ce projet est de déterminer, sur un modèle murin, si les effets de ces deux thérapies sont additifs, ce qui permettrait le cas échéant de les combiner.

L'imatinib est administré par voie orale, alors que la neoBOMB1 est administrée par voie intraveineuse après couplage avec un isotope radioactif (on parle de radiothérapie interne vectorisée). Le modèle d'étude sera la souris immunodéficiente chez laquelle on aura préalablement implantée au niveau sous-cutané des cellules d'une lignée humaine de tumeur gastrointestinale. L'étude comprendra au total 105 animaux. Tout sera mis en œuvre pour respecter la règle des 3R (Remplacer, Réduire et Raffiner) Les molécules ont été préalablement validées *in vitro*. Les animaux seront hébergés dans une animalerie agréée en groupe avec enrichissement du milieu de vie des points limites adaptés, tel qu'un volume tumoral maximal, seront utilisés afin de réduire le stress et la souffrance un suivi quotidien de leur bien-être sera réalisé le protocole expérimental sera réalisé chez les animaux anesthésiés (Isoflurane 1,5 -2 %) pendant moins d'une heure. Durant cette phase d'anesthésie un onguent sera appliqué sur la cornée des animaux pour éviter toute sécheresse oculaire et la température corporelle sera maintenue grâce à un lit thermostaté. Enfin, le nombre minimum de mesures et d'animaux permettant le recueil de données statistiquement exploitables sera utilisé.

15265 La vaccination par voie orale représente une alternative intéressante à la vaccination parentérale contre les maladies infectieuses chez l'animal et en particulier chez le chien. L'avantage majeur de ce mode d'administration est sa facilité d'utilisation et le ciblage en particulier de la muqueuse intestinale véritable porte d'entrée pour de nombreux pathogènes infectieux et non infectieux. De plus, la muqueuse intestinale représente un site important pour l'induction de la réponse muqueuse mais aussi systémique. Une des infections respiratoires majeures chez le chien est la toux de chenil, maladie multi-étiologique, où *Bordetella Bronchiseptica* (Bb) et le virus canin para-influenza (CPI) sont les responsables principaux de la physiopathologie infectieuse.

Nous souhaitons dans un premier temps comprendre les mécanismes d'action d'un candidat vaccin oral actuel développé par une société contre *Bordetella Bronchiseptica*. Ce vaccin reste peu efficace mais nous permettra d'établir des corrélats de protection, à partir de biomarqueurs d'activation, nécessaires à l'élaboration de nouveaux candidats vaccins muqueux combinant de nouveaux antigènes à des adjuvants. Une des difficultés majeures dans l'élaboration et l'évaluation de nouveaux candidats vaccins sont en partie éthique avec la nécessité d'une évaluation préclinique chez le chien. C'est pourquoi, nous souhaitons dans un premier temps mettre en place et développer un modèle d'infection chez le rat de *Bordetella Bronchiseptica* qui vient récemment d'être décrit dans la littérature. Ce modèle très proche de la physiopathologie animale mais aussi

humaine nous permettra d'évaluer l'efficacité du vaccin et d'identifier des corrélats de protection. Sachant que le rat n'est pas la cible naturelle de *Bordetella Bronchiseptica*, les symptômes attendus après l'inoculation de la bactérie sont légers. Dans une étude précédente décrivant le modèle, le seul symptôme décrit chez le rat, suite à l'inoculation de *Bordetella Bronchiseptica*, est la toux.

Le nombre de rats nécessaires a été réduit au minimum sans compromettre l'analyse statistique de nos résultats. Une définition précise des points limites et une surveillance adaptée des animaux par un personnel compétent permettra de limiter au maximum toute souffrance animale. Nous prévoyons d'utiliser au maximum 276 animaux sur une période de 5 ans.

Chaque animal bénéficiera d'une attention et de soins de qualité, par du personnel qualifié, pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. La douleur sera rigoureusement contrôlée grâce à des points limites évalués en amont, et gérée grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (anesthésie/analgésie). Par ailleurs, les animaux seront hébergés en groupes harmonieux (par 3) dans un environnement enrichi (copeaux, matériel de nidification, bâtonnets à ronger). Enfin, l'eau et la nourriture sont mises à disposition "ad libitum" et de la musique est diffusée en salle d'hébergement pour diminuer le stress et atténuer les bruits environnementaux.

15266 L'insuffisance cardiaque est la première cause de mortalité chez l'adulte. Cette pathologie est souvent liée à des défauts congénitaux cardiaques, c'est à dire des malformations structurales dont les plus sévères affectent 1/100 naissances. Mieux comprendre les mécanismes moléculaires qui dirigent le développement cardiaque permettra d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques contre cette pathologie.

Ce projet vise à déterminer le rôle du gène NIPBL dans le développement cardiaque. Des patients ayant une mutation dans ce gène sont atteints du syndrome Cornelia de Lange (CdLS), caractérisée par des défauts de développement des organes, et notamment du cœur. NIPBL est un composant d'un complexe protéique (complexe cohesine) qui joue un rôle essentiel dans la régulation de l'expression de l'ensemble des gènes. L'impact d'un défaut de NIPBL spécifiquement dans le cœur reste inconnu. Ainsi, ce projet devrait permettre de mieux comprendre le développement cardiaque d'un point de vue de la science fondamentale en caractérisant le rôle de NIPBL lors de la cardiogenèse. Aussi, le projet pourrait offrir de nouvelles perspectives thérapeutiques aux patients CdLS, en caractérisant les dysfonctionnements liés à une déficience de NIPBL chez ces patients.

Afin d'étudier le rôle de NIPBL dans la cardiogenèse, ce gène sera génétiquement inactivé. Les cœurs des souris adultes seront analysés par diverses approches (échographie, histologie, analyses moléculaires).

Ce projet a été conçu en respectant la règle des 3R. Remplacement une partie de cette étude, qui emploie une technique nécessitant de grands nombres de cellules (ChIP-seq, Immunoprecipitation de chromatine), sera réalisée à l'aide d'un modèle *in vitro* de différenciation cardiaque de cellules souches. Cette approche reste néanmoins complémentaire du modèle *in vivo* souris, indispensable pour étudier un processus aussi complexe que la morphogenèse cardiaque et identifier et caractériser des cibles thérapeutiques pertinentes pour l'Homme. Réduction des tests statistiques ont été réalisées afin d'établir le nombre minimum de souris à utiliser afin de pouvoir réaliser une étude avec des conclusions robustes. Raffinement les mesures nécessaires seront mises en place pour assurer des conditions de stabulation optimales et limiter la souffrance animale. Une examination quotidienne des animaux permettra de déceler l'apparition de signes de douleur : perte de poids, diminution d'activité, apparence négligée, lésions cutanées. Une grille d'évaluation quantitative sera utilisée pour le suivi des animaux, ce qui permettra d'apporter immédiatement des solutions adaptées (analgésie, point limite atteint) aux éventuels cas d'animaux en souffrance.

Pour réaliser ce projet nous allons avoir besoin d'un total de 160 souris.

15267 Ce projet d'expérimentation concerne essentiellement une activité de service du Laboratoire. De nouveaux produits de soins et de confort sont régulièrement développés pour le cheval de courses

et de compétition. Ces crèmes, lotions ou onguents sont utilisés pour améliorer le confort du cheval (soin relaxant, préparateur à l'effort, amélioration de la récupération après le travail, répulsif insecte, lustrant du poil).

Des compléments alimentaires sont destinés à optimiser la condition physique du cheval de compétition. Ces produits peuvent contenir des substances prohibées au regard du code des courses au trot et au galop. Les doses utilisées sont généralement faibles et ne doivent pas entraîner de positivité au regard du contrôle antidopage mais il convient de la vérifier.

Le produit à tester est appliqué par exemple soit sous forme de pommade sur les membres du cheval ou le recouvre complètement (technique d'enveloppement). Les compléments alimentaires sont administrés par voie orale le plus souvent mélangés à l'alimentation ou donnés à la seringue buccale (pré-conditionnement sous cette forme).

La composition de ces produits de soin est variée et complexe, ces produits peuvent contenir des huiles essentielles dont la composition est complexe.

L'application ou l'administration de ces produits sur un cheval d'expérimentation est indispensable afin de vérifier que les échantillons collectés après l'administration ne contiennent pas de substances prohibées.

Dans cette saisine, la règle des 3R a été suivie comme suit

-Remplacer cette étude ne peut être réalisée que chez l'animal vivant et sur l'espèce cheval. Des analyses *in vitro* ne sont pas possibles.

-Réduire le nombre d'animaux impliqués est réduit au maximum. Ces essais sont généralement conduits sur un, deux ou trois chevaux.

-Raffiner Les chevaux sont quotidiennement surveillés et observés. Tout éventuel signe d'inconfort est noté afin d'optimiser les tests ultérieurs.

15268 L'ADN, vecteur de l'information génétique, est constamment exposé à des dommages génotoxiques. Ces dommages sont très efficacement réparés pour éviter l'altération de l'intégrité du génome. Les défauts de réparation de l'ADN, notamment dans certaines maladies génétiques, conduisent à diverses pathologies telles que neurodégénération, déficits immunitaires ou cancers.

Nous générons des modèles murins d'altération des processus de réparation de l'ADN afin de mieux comprendre le développement normal du système nerveux central et du système immunitaire, d'apprécier les conséquences du défaut de ces processus dans certaines maladies génétiques et dans le développement des cancers afin d'entrevoir de nouvelles solutions thérapeutiques pour ces maladies.

Le développement du système nerveux central et du système immunitaire sont des procédés complexes pour lesquels il n'existe malheureusement pas de modèles cellulaires *in vitro* permettant une vision globale. Les souris de laboratoires constituent des modèles particulièrement bien étudiés de ces fonctions. Nous générons ainsi des modèles de souris par l'introduction de mutations dans les gènes codant pour des facteurs impliqués dans les voies de réparation de l'ADN pour faire une étude phénotypique sans intervention. Les phénotypes observés sont en général assez homogènes, ce qui permet une réduction du nombre d'animaux à étudier. L'obtention, à partir de ces animaux, de lignées cellulaires immortalisées *in vitro* permettra d'en réduire le nombre.

Dans les formes les plus sévères, les altérations des mécanismes de réparation de l'ADN se traduisent par une létalité embryonnaire. L'analyse des embryons permet alors d'appréhender le rôle de ces facteurs. Dans d'autres cas, les animaux sont viables mais présentent des déficits immunitaires. Ils sont alors particulièrement sensibles aux infections par des agents pathogènes et nous prévoyons donc un raffinement en zone protégée pour éviter leur exposition à ces agents. Les parents ne présentent en général aucun déficit et se comportent comme des animaux sains.

Nous avons créé par la méthode de CRISPR/Cas9, 4 modèles de souris mutées dans des voies de réparation de l'ADN. La présente demande porte sur leur élevage, leur croisement sur d'autres souches d'animaux mutés et leur analyse non invasive afin d'évaluer le caractère dommageable de ces mutations sur la viabilité des animaux et leur compétence immunitaire. Il nécessite, tout modèle

confondu, l'analyse d'un maximum de 740 animaux (pouvant être revu à la baisse en cours d'expérience) pour satisfaire aux règles statistiques. Compte tenu des différents croisements il s'étend sur 4 ans.

Nous avons mis en place une grille de suivi des animaux pour l'évaluation d'un possible mal-être. Au delà d'un seuil prédictif de souffrance, les animaux seront mis à mort.

Nos études devraient permettre une meilleure compréhension des mécanismes liés au développement des cancers dans la mesure où ceux-ci sont assez largement associés à des dysfonctionnements de la réparation de l'ADN (ex mutations de BRCA2 et cancer du sein).

15269 Ce projet a pour objectif l'évaluation de la toxicité spécifique des vaccins, des immunosuppresseurs et de leurs composants destinés à l'Homme, selon les normes d'innocuité et de sécurité réglementaires. Ces tests incluent les évaluations de stabilité des vaccins requises par la réglementation ainsi que la formation / qualification du personnel à ces tests requis par les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF).

Les tests de toxicité spécifiques consistent à administrer un produit à des animaux, les héberger pendant la période nécessaire à la vérification de l'absence d'effet indésirable, par exemple lié à une toxine mal inactivée ou à une réversion de l'anatoxine en toxine. Ceci permet le contrôle de la détoxification suffisante du produit testé.

Ce projet représente l'ensemble des essais libératoires menés pour les lots de produits fabriqués en fonction de leur spécification. Les espèces employées sont la souris, le cobaye et le rat.

Dans le cas où les animaux présenteraient une dégradation de l'état général, des lésions ou des symptômes nécessitant l'euthanasie, celle-ci sera effectuée selon la méthode réglementaire recommandée. La prise en charge d'un animal ayant des signes cliniques de maladie est réalisée sous la responsabilité d'un vétérinaire.

Le degré de sévérité est considéré comme allant de modéré à sévère pour les rats. Il est considéré comme léger pour les cobayes et de léger à sévère pour les souris.

L'ensemble des 9 procédures de ce projet peut nécessiter l'utilisation de 51 000 souris, 4 600 cobayes et 5 700 rats au maximum sur une période de 5 ans (estimation basée sur l'historique ainsi que le prévisionnel de production/libération).

Les bénéfices attendus de ce projet sont de contribuer à la libération des lots de produits fiables et conformes aux spécifications et aux textes de référence en vigueur.

En fin de test, l'ensemble des animaux utilisés est euthanasié selon les méthodes recommandées par la réglementation, par la Structure chargée du Bien-Etre des Animaux et approuvées par le Comité d'Éthique.

Mise en œuvre des 3Rs

Remplacement

Une méthode *in vitro* est en cours de développement pour remplacer les tests *in vivo* d'une des procédures du présent projet. Il est estimé que 9000 souris par an sont actuellement utilisées pour cette procédure

Réduction

Le nombre d'animaux utilisés au total est calculé au plus juste de façon à répondre aux exigences réglementaires et aux besoins des procédures expérimentales sur une période de 5 ans.

Le nombre d'animaux par groupe est défini par la réglementation. En revanche, une optimisation visant à réduire le nombre de groupes témoins est pratiquée aussi souvent que possible.

Raffinement

Les animaux sont hébergés en groupe dans des locaux appropriés et dans des cages contenant des enrichissements conformément aux standards réglementaires (ETS 123). Ces animaux sont suivis par un personnel spécifiquement formé.

En cas de signes cliniques, les animaux bénéficient des soins vétérinaires ou sont euthanasiés dans les meilleurs délais selon les méthodes recommandées.

15270 Réparation de défauts trachéaux par allogreffes aortiques pré-conditionnées chez le rat

Après la résection de plus de de la moitié de la trachée chez l'adulte et l'enfant pour des raisons carcinologique ou traumatiques, la suture directe des extrémités trachéales restantes est impossible. Des études ont déjà été menées sur la brebis, puis sur l'homme permettant la réparation de ces défauts trachéaux par une allogreffe aortique. Mais l'intégration du greffon aux tissus du receveur reste un processus long. La colonisation du l'allogreffe aortique pourrait être accélérée par un pré-conditionnement *in vitro* afin d'ouvrir des pores au sein de ce greffon pour en faciliter la colonisation. Plusieurs conditionnements du greffon aortique avant ensemencement par des cellules épithéliales et des cellules souches ont pu être testés avec succès *in vitro*.

Ce projet de recherche médicale appliquée vise l'objectif suivant comparer l'implantation *in vivo* d'allogreffes aortiques pré-conditionnées *in vitro*, versus des greffons dits "nus" dans le cadre d'un remplacement de segment trachéal.

Les 3 types de pré-conditionnements testés seront [SEP]

- la lyophilisation [SEP]

- la digestion enzymatique

- l'association d'une mousse à la face externe de l'aorte.

L'avantage de ce projet est de tester simultanément 3 méthodes de pré-conditionnement différents permettant ainsi de réaliser un unique projet d'expérimentation animale, avant d'espérer une application chez l'Homme.

L'évaluation de l'intégration du greffon nécessite le maintien du greffon pendant 3 mois au sein des tissus du receveur et ainsi le recours indispensable à un organisme vivant. La procédure de mise en place du greffon est une procédure invasive et est donc l'inconvénient principal de ce projet.

L'expérimentation sera réalisée dans le respect des textes réglementaires relatifs à la protection et à l'utilisation des animaux de laboratoire. Le projet s'inscrit dans une démarche éthique suivant la règle des 3R (Réduire, Raffiner, Remplacer) en optimisant les conditions de vie, d'hébergement et de soins des animaux.

Une analgésie sera ainsi réalisée de manière systématique durant 5 jours. Une surveillance des animaux sera effectuée 2 fois par jour. En cas de signes de souffrance de l'animal, les mesures nécessaires seront prises à savoir analgésie, nettoyage de plaie cervicale voire euthanasie si difficulté respiratoire, ou si le point limite est atteint (signes de souffrance de l'animal non accessible à un traitement médical et/ou chirurgical).

L'étude *in vivo* sera réalisée sur 40 animaux (n = 10 pour chaque groupe), nombre minimal pour obtenir de résultats statistiquement valides étant donné que 3 types de conditions seront testés et qu'un groupe contrôle est nécessaire. Les greffons seront implantés en remplacement d'un défaut trachéal de 2 cm² sous anesthésie générale sur le rat.

A 3 mois, le greffon sera retiré après euthanasie induite préalablement par une anesthésie générale des 10 rats de chaque groupe pour une analyse histologique de celui-ci.

15271 Récemment, le traitement du mélanome cutané métastatique a connu une révolution grâce au développement de thérapies qui stimulent les cellules immunes « anti-tumorales ». L'efficacité thérapeutique à long terme est cependant entravée par la présence, au niveau de la tumeur, de molécules susceptibles de favoriser l'activité « pro-tumorale » des cellules immunes. Parmi ces molécules, les enzymes dégradant les acides aminés sont aujourd'hui des cibles thérapeutiques de premier choix. Ce projet vise à étudier l'impact de deux d'entre elles sur la réponse immunitaire et le développement d'un mélanome de la choroïde de l'œil. En particulier leur rôle pro-tumoral a été observé suite à la génération de souris dont les gènes respectifs ont été inactivés.

En plus de leur capacité à limiter l'activité anti-tumorale des cellules immunes, ces enzymes sont capables d'éliminer des microbes. Des travaux récents établissent que la composition en bactéries de notre corps, notamment au niveau de l'intestin, façonne la réponse anti-tumorale naturelle ou en réponse aux immunothérapies.

Nous émettons l'hypothèse qu'au cours du développement tumoral, l'expression accrue des enzymes du métabolisme des acides aminés favorise l'accumulation de bactéries pro-tumorales aux niveaux de l'œil (site du mélanome primaire), de la peau (site de métastases) et de l'intestin contribuant à l'accumulation de cellules immunitaires pro-tumorales et donc à l'agressivité du mélanome.

L'objectif est donc d'évaluer si ces enzymes modifient la composition bactérienne à ces différents sites. Des bactéries « pro » ou « anti » tumorales chez les souris sauvages ou déficientes pour nos gènes d'intérêt seront identifiées, puis évaluées pour leur impact sur la réponse immunitaire et la progression tumorale dans des modèles de mélanome.

Le développement tumoral sera soit spontané chez des souris développant un mélanome uvéal primaire qui se développe à l'âge de 3 semaines puis métastase rapidement, soit induit par des transplantations de cellules de mélanome chez les souris sauvages ou déficientes pour nos gènes d'intérêt. Les souris seront soumises soit à des traitements par antibiotiques, soit à des transferts des bactéries que nous identifierons, pour évaluer l'importance de la composition en bactéries du microbiote dans la progression du mélanome. Cette étude ne peut être atteinte par des techniques de « remplacement » *in vitro*.

L'utilisation d'animaux est justifiée par la complexité de la réponse immunitaire *in vivo* dans la tumeur et les organes lymphoïdes secondaires des vertébrés qui ne peut être reproduite par des méthodes alternatives *in vitro* ou *ex vivo*. Nous souhaitons également évaluer directement *in vivo* l'impact de la composition bactérienne des souris sur le développement de la tumeur primaire et la dissémination métastatique.

Elle nécessitera l'utilisation de souris sauvages et génétiquement modifiées. Seul le phénotype des souris développant spontanément un mélanome est dommageable. Bien que la maladie progresse avec une cinétique différente d'une souris à l'autre dans ce modèle, les données bibliographiques permettent de réduire au maximum le nombre de souris nécessaires pour l'étude.

En terme de « réduction », des lots d'animaux les plus restreints possibles mais suffisants seront utilisés pour obtenir des données statistiques fiables. Chaque souris développant spontanément un mélanome sera suivie quotidiennement et mise à mort à 5 semaines pour une analyse post-mortem des cellules infiltrant la tumeur primaire et les métastases. La tumeur des souris transplantées avec les cellules de mélanome B16 sera aussi mesurée 3 fois par semaine.

Les animaux disposent de nourriture et d'eau *ad libitum*. Le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification et de maisons. Nous nous efforcerons à chaque instant de raffiner nos procédures afin de garantir le bien-être des animaux grâce à une surveillance attentive et des soins adaptés. L'administration d'antalgiques n'étant pas compatible avec notre étude scientifique, des points limites ont été définis et permettront de mettre à mort l'animal de façon anticipée en cas de souffrance.

Le nombre total de souris utilisé sur 5 ans sera de 1473 pour l'ensemble du projet qui se déroulera sur cinq ans. Ce projet permettra d'élucider les mécanismes d'action de ces enzymes dans le contexte tumoral.

15272 L'arrêt cardio-respiratoire (ACR) est l'une des principales causes de mortalité au niveau mondial. Il en est de même en France et il constitue donc un enjeu de santé publique majeur. L'ACR est associé à un taux de survie particulièrement faible et est considéré comme l'une des plus grandes priorités de santé publique, en France. L'incidence annuelle concerne environ 500 000 patients en Europe. En France, le nombre d'arrêts cardiaques est estimé à 46.000 par an, associé à un taux de survie entre 5 et 15 %. Malgré tous, les progrès techniques de ces dernières années (distribution plus large des défibrillateurs automatiques externes et une extension de leurs utilisateurs potentiels) à permis une augmentation des chances de survie et une amélioration des taux de survie après un

ACR. Malheureusement, parmi les patients dont l'arrêt cardiaque a été initialement réanimé avec succès, environ 70 à 90% d'entre eux ont des séquelles majeure et irréversible. En effet, la plupart vont présenter dans les heures, puis les jours qui suivent l'ACR, un état de choc caractérisant le syndrome de reperfusion précoce post-arrêt cardiaque.

L'arrêt cardio-respiratoire réanimé (AC2R) constitue ainsi la situation clinique la plus proche du phénomène d'« ischémie-reperfusion » bien connu grâce aux modèles expérimentaux. En l'absence de traitement rapide et adapté, cette « maladie post-arrêt cardiaque » aboutit en règle générale à un syndrome de défaillance multiviscérale et au décès rapide ou à un pronostic neurologique sombre deux tiers environ des patients qui survivent au syndrome de reperfusion précoce ont par la suite des séquelles neurofonctionnelles évoluant soit vers un décès, soit vers un état végétatif persistant puis permanent. La physiopathologie de ce syndrome explique les manifestations observées et justifie les moyens thérapeutiques, parfois très lourds (assistance circulatoire par oxygénateur extracorporel à membrane), qui doivent être mis en œuvre pour parvenir à une évaluation neurologique satisfaisante. Cependant l'arsenal thérapeutique mis en branle pour limiter les séquelles neurologique et multiviscérale reste encore bien limité. A part l'hypothermie, il n'existe aucune intervention médicamenteuse efficace pour réduire la mort neuronale et les déficits multiviscérales chez les patients atteints d'AC2R.

De ce fait, une identification précise des mécanismes physiopathologiques et moléculaires lors des arrêts cardio-respiratoire rescuscité constitue un enjeu majeur car elle permettra d'identifier de nouvelles voies thérapeutiques pour optimiser les prises en charge des patients et donc d'améliorer le taux de survie et la prévention des séquelles neurologiques et multiviscérales.

Dans ce cadre, nous envisageons d'évaluer le potentiel de la metformine, agent hypoglycémique de première intention pour le traitement du diabète de type 2, pour prévenir les lésions multiviscérales dans un modèle murin d'AC2R. Des études cliniques et expérimentales récentes ont démontré que la metformine possédait une variété d'autres effets bénéfiques allant au-delà de son effet d'abaissement du glucose. Une étude prospective britannique sur le diabète a montré qu'un traitement à long terme par la metformine pouvait effectivement réduire l'incidence des accidents vasculaires cérébraux et la mortalité cardiovasculaire. La metformine est également efficace dans le traitement de l'ischémie cérébrale globale, de l'hémorragie intracérébrale, de l'épilepsie, de la maladie de Parkinson. Cependant, le traitement à la metformine est-il efficace pour réduire les lésions cérébrales et restaurer la microcirculation après un AC2R ?

Pour ce projet, nous utiliserons 128 souris, sur une durée totale de projet de 5 années. Notre démarche s'inscrit dans le respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 (« règle des 3R

»). Réduction : Afin de réduire le nombre d'animaux, le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour obtenir des résultats statistiquement interprétables et les élevages seront utilisés au mieux puisque les études seront menées sur des mâles et femelles. Par ailleurs, l'échographie est une technique non invasive qui présente l'avantage de pouvoir étudier une cohorte d'animaux en fonction de l'évolution de la maladie, permettant également de réduire le nombre d'animaux. Les animaux feront l'objet d'une surveillance régulière par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié de l'animalerie. Raffinement : Afin de réduire au maximum la douleur et l'angoisse que certains protocoles pourraient engendrer chez les animaux, des points limites ont été définis. Tous les animaux auront

à leur disposition de la boisson et de la nourriture à volonté, et leur milieu sera enrichi à l'aide de carrés de coton pour la construction d'un nid, ainsi que de litière mélangée à des copeaux. Remplacement : Malgré leurs caractères délétères, ces interventions sont nécessaires pour reproduire dans un système intégré, l'animal, les différentes composantes de la pathologie humaine. Il n'existe actuellement aucune méthode (*in vitro* ou *in silico*) permettant de suivre l'évolution de la dysfonction multi-viscérale post AC2R. Notre approche expérimentale est un gage d'une meilleure transposition vers la clinique dont le besoin de nouveaux traitements est urgent.

15273 Le syndrome de défaillance multi-viscérale (SDMV) est une dysfonction d'au moins deux organes vitaux. Cela est provoqué par les maladies graves rencontrées en réanimation (arrêt cardiaque, greffe d'organes, choc septique ou hémorragique, etc). C'est un phénomène fréquent en soins intensifs, avec une morbi-mortalité élevée et un syndrome inflammatoire majeur, qui aggrave le pronostic. La gestion du SDMV repose sur le traitement de sa cause et sur un traitement symptomatique médicamenteux et/ou mécanique visant à pallier les défaillances d'organe. Une autre approche pourrait-être l'utilisation d'Argon par voie inhalée, compte tenu de l'action anti-ischémique et anti-inflammatoire des gaz nobles. Les effets organo-protecteurs de ce gaz noble ont déjà été mis en évidence dans de précédents travaux. Cependant, les effets sur les paramètres cardiovasculaires de l'Argon sont mal compris.

L'objectif de ce projet est de déterminer précisément si l'inhalation d'Argon peut induire des effets immédiats sur les paramètres cardiovasculaires, en fonction des conditions de « remplissage » des ventricules gauches et droits. Cela est important pour mieux définir les conditions dans lesquelles le bénéfice de l'Argon pourrait être maximal chez l'homme.

Compte tenu de la nature des maladies étudiées et de l'évaluation d'approche thérapeutique « intégrée », il n'est pas possible de mimer cette situation *in vitro* (absence de Remplacement possible). Nous avons déterminé le nombre d'animaux le plus faible pour pouvoir conduire cette expérience (Réduction). Au total, nous utiliserons 56 lapins. Enfin, le protocole expérimental a été conçu de façon à lutter contre toute forme de souffrance (animaux anesthésiés sous antalgiques) (Raffinement).

15274 Ce projet vise à fournir une percée dans la livraison chimiothérapeutique vectorisée de drogues par des vecteurs sonosensibles. Les vecteurs sonosensibles utilisés offrent une avancée prometteuse dans le traitement du cancer. Ils sont constitués de nanogouttes récemment brevetées composées de perfluorocarbone et d'huile qui permettent une encapsulation de drogues hydrophobes. Ces nanogouttes représentent un outil non invasif qui peut être employé pour la libération localisée de drogues induites par ultrasons et guidées par IRM du fluor (grâce à la présence du perfluorocarbone). En appliquant des impulsions acoustiques de faible intensité, on peut soit déstabiliser ou vaporiser les nanogouttes afin de libérer les substances actives qu'elles contiennent. Cette approche thérapeutique doit permettre de diminuer les effets secondaires des anticancéreux tout en gardant leurs efficacités.

Ce projet utilisera au maximum 566 souris (immunocompétentes et immunodéficientes).

Les procédures expérimentales mises en jeu respecteront les exigences de remplacement, réduction et raffinement.

Ce projet nécessite l'implication d'animaux vivants car ce projet, dans lequel les nanoémulsions étudiées sont protégées par 3 brevets qui financeront les mesures sur le petit animal, a comme objectif de se diriger vers l'utilisation clinique de ces nanoémulsions, ce qui impose des tests précliniques indispensables sur le petit animal.

Ce projet de la durée de 5 ans prévoit des expériences de croissances tumorales chez la souris. L'étude sera arrêtée si l'expérience initiale invalide l'hypothèse de travail. De plus, les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux (expérimentateurs expérimentés, enrichissement prévu, veille bibliographique constante).

Le nombre total de souris calculé pour réaliser ce projet sur 5 ans tient compte d'un nombre minimum de souris réduit au minimum statiquement et scientifiquement. De plus, le maximum de précaution a été réalisé afin de minimiser la souffrance des souris.

15275 La dystrophie myotonique de type 1 (DM1) est une des maladies neuromusculaires les plus fréquente chez l'adulte.

Elle est caractérisée par une myotonie, une faiblesse musculaire progressive, des troubles cardiaques ainsi que cognitifs. La DM1 est causée par l'expansion de répétitions CTG dans la partie 3' non-codante du gène DMPK (DM Protein Kinase). Cette mutation génétique conduit à la perte de fonction des protéines de la famille MBNL (muscleblind-like) et conduisent ultimement, à des

symptômes cliniques. La famille des protéines MBNL est composée de MBNL1, MBNL2 et MBNL3. MBNL1 est majoritairement exprimé dans le muscle squelettique, cardiaque et le cerveau, MBNL2 est principalement retrouvé dans le cerveau. Alors que la fonction de MBNL1 et MBNL2 au niveau du muscle squelettique et du cerveau est extensivement étudié à ce jour, leurs rôles au niveau la moelle épinière et plus particulière dans les motoneurones (MN) ne sont pas connus. Les motoneurones vont innerver le muscle squelettique et commander sa contraction. L'objectif du projet est de déterminer *in vivo* la contribution de la perte de fonction de MBNL1 et MBNL2 spécifiquement dans les motoneurones et sa contribution aux atteintes musculaires observés chez les patients DM1. Pour ce projet, nous avons développé une lignée de souris triple-transgénique (Hb9-MBNL1/2) permettant la déplétion de Mbnl1 et Mbnl2 spécifiquement dans les motoneurones.

Plusieurs questions seront adressées au cours des 5 ans de ce projet

-Effets moléculaires de la déplétion de MBNL1 et/ou 2 dans les motoneurones chez la souris à différents âges.

-Effet de la déplétion de MBNL1 et/ou 2 dans les motoneurones sur la formation et le maintien des connexions nerf-muscle via les jonctions neuromusculaires, et la formation et la structure du muscle squelettique chez la souris à différents âges.

-Effet de la déplétion de MBNL1 et/ou 2 dans les motoneurones sur la fonction du muscle squelettique chez la souris à différents âges.

Au total, l'ensemble de ce projet de recherche d'une durée de 5 an nécessitera l'utilisation de 240 souris tous génotypes, âges et des sexes confondus.

Les procédures décrites prévoient l'utilisation de souris en adéquation avec la règle des 3R.

1-Remplacer Des modèles cellulaires *in vitro* pour l'étude des motoneurones dans la DM1 ont déjà été développés.

Cependant l'évaluation de l'impact de la perte de fonction de Mbnl1 et Mbnl2 spécifiquement dans les motoneurones sur la fonction musculaire nécessite des modèles *in vivo* de souris reproduisant ce phénomène. Enfin, aucune méthode de remplacement n'existe pour évaluer un muscle mature, une connexion motoneurone-muscle mature ou pour mesurer la force que le muscle est capable de produire lors de contractions.

2-Reduire Afin de réduire et d'optimiser le nombre d'animaux, le protocole d'étude proposé a été développé avec une réduction du nombre d'animaux utilisés dans la mesure où toutes les souris obtenues lors de nos croisements pour générer notre modèle MN-dKO seront analysées et constituent les contrôles nécessaires à cette étude (souris sauvages, invalidées pour MBNL1 seulement (MBNL1 KO), invalidées pour MBNL2 seulement (MBNL2 KO) et invalidées pour MBNL1 et MBNL2 (MN-dKO). De plus, différentes évaluations phénotypiques se feront au cours de la vie des souris à différents âges.

3-Raffiner Toutes les précautions seront prises afin de réduire à son maximum le stress et la souffrance animale.

L'entretien des souris ainsi que les différents protocoles expérimentaux seront assurés par du personnel qualifié et le bien-être des animaux sera amélioré par la mise en place d'un enrichissement de milieu. Les procédures expérimentales invasives seront réalisées sous anesthésie/analgésie

15276 La pathologie qui fait l'objet de cette étude est caractérisée par une dégénérescence des neurones du cervelet. Les symptômes associés sont des troubles de l'équilibre et de la coordination conduisant à un handicap sévère en quelques mois. Elle touche principalement des femmes atteintes d'un cancer gynécologique (ovaire, sein). Chez ces patientes, le système immunitaire normalement responsable de détruire la tumeur, s'attaque également aux neurones du cervelet et les détruisent. Le diagnostic est confirmé par la détection d'anticorps présents dans le sang et dans le cerveau dont la caractéristique est de reconnaître les neurones du cervelet.

La théorie en vigueur suppose que la tumeur est responsable de l'activation du système immunitaire et par des mécanismes encore mal compris, le système immunitaire va également s'activer dans le

cerveau et détruire les neurones du cervelet. Afin d'étudier les mécanismes à l'origine de la pathologie, le recours à un modèle animal est indispensable à cause de la rareté des échantillons de patientes et permettra des analyses plus approfondies depuis l'apparition de la tumeur jusqu'à la destruction des neurones. L'objectif principal de ce protocole expérimental est donc de développer un modèle de la maladie chez la souris qui soit au plus proche de la maladie humaine.

Le protocole expérimental consistera à implanter sous la peau des cellules cancéreuses sur le flanc des souris pour permettre le suivi du développement tumoral. Une vaccination dirigée contre la tumeur activera la réponse immunitaire et des associations de traitements seront testées pour initier une réponse immunitaire dans le cerveau. La destruction des neurones du cervelet des souris sera évaluée par des tests de coordination et de motricité, et par des analyses sur coupe de cerveau. Une analyse du sang permettra d'identifier la présence d'anticorps spécifiques. Le protocole expérimental permettra également de caractériser la réponse immunitaire au sein de la tumeur et du cerveau afin d'étudier le rôle de la tumeur dans le développement de la maladie.

La règle des 3R sera appliquée conformément à la directive Européenne (I) Des études réalisées à partir du sang des patientes ont permis d'identifier les protéines ciblées dans les neurones du cervelet. Ces mêmes protéines ont été identifiées dans les tumeurs. Un modèle de la maladie chez la souris est désormais indispensable pour comprendre les mécanismes qui conduisent à la destruction des neurones du cervelet. Aucune méthode alternative ne permet de satisfaire l'objectif de Remplacement à notre connaissance (II) Dans un souci de raffinement de la procédure expérimentale une phase pilote sera mise en place pour évaluer le modèle d'implantation de la tumeur en sous-cutané. Le recours à ce modèle implique une connaissance précise de l'évolution de la tumeur et de son impact sur la motricité et le bien-être de nos souris. Une grille d'évaluation de la souffrance et de la détresse de l'animal a été mise en place pour anticiper au mieux les points limites. Du fait de la courte durée de la procédure expérimentale (12 semaines maximum), et de la calibration optimale du modèle tumoral, les symptômes attendus seront faibles et n'impacteront pas de manière significative sur le bien-être animal. (III) Le projet sera découpé en plusieurs phases afin de hiérarchiser les expérimentations et réduire le nombre d'animaux. A chaque étape une première série d'expérimentations sera réalisée sur la moitié de l'effectif prévu. Si une tendance est observée mais n'est pas significative, la manip sera dupliquée pour consolider les résultats. Soit au maximum 300 souris au total.

Le nombre d'animaux est également réduit au maximum en réalisant les tests de comportement et les différentes analyses sur les souris d'un même lot.

Grâce à ce modèle de la maladie, l'identification des mécanismes qui conduisent à l'activation des défenses immunitaires contre les neurones du cervelet des patientes permettra à terme de développer une thérapie efficace pour guérir les femmes atteintes de cette maladie.

15277 La formation du personnel est nécessaire et obligatoire pour la mise en œuvre de tests *in vivo*. A ce jour, dans le cadre de nos activités de développement de nouveaux vaccins, cette formation ne peut pas être effectuée sans le recours à l'animal de laboratoire. Ce projet a pour objectif de former et valider les nouveaux expérimentateurs ou expérimentateurs n'ayant pas pratiqué depuis plus de 6 mois aux manipulations « *in vivo* » standards sur la souris, le rat, le cobaye, le lapin, le hamster, le furet et le mini-porc, sous la responsabilité de manipulateurs référents (système de compagnonnage). Cette formation permet également d'enseigner la mise en œuvre des conditions de bien-être des animaux et d'éthique du comportement individuel. Ce système de formation permet d'avoir des personnes en charge des gestes techniques parfaitement formés et compétents et travaillant de façon harmonisée avec du matériel optimisé.

Ce projet pourrait engendrer l'utilisation d'au maximum 2 500 souris, 150 rats, 150 hamsters, 150 cobayes, 100 lapins, 30 furets et 30 mini porcs sur une période de 5 ans. Le degré de sévérité est considéré comme léger pouvant aller jusqu'à modéré pour la formation de personnes débutantes ne maîtrisant pas certaines techniques, certains gestes non maîtrisés pouvant induire une réaction inflammatoire locale.

Chaque animal est observé quotidiennement au moins une fois par jour durant toute la durée de la formation. Dans le cas où les animaux présenteraient des lésions cutanées des soins appropriés seront réalisés. Tout animal qui présenterait une altération d'état général ou des signes cliniques sévères sera euthanasié selon une méthode recommandée. La prise en charge d'un animal ayant des signes de maladie est assurée par un vétérinaire. Si les animaux peuvent être réutilisés ou replacés, les animaux seront maintenus en vie. Sinon, l'ensemble des animaux sera euthanasié selon des méthodes recommandées par la réglementation et approuvées par le Comité d'Ethique (CE) et la Structure de Bien-être Animal (SBEA).

Mise en œuvre des 3R

Remplacement : Il est indispensable d'utiliser des animaux vivants afin de se former aux techniques d'injection et de prélèvement et ainsi, de pouvoir observer qu'aucun impact clinique n'est constaté suite à la réalisation des gestes techniques. Tous les gestes techniques ont été revus et sont approuvés par la SBEA.

Réduction : Le nombre d'animaux utilisés sera raisonné selon le nombre de personnes à former, l'expérience de ces personnes, le nombre de techniques à apprendre, la difficulté technique, le nombre de techniques réalisables sur un même animal et sur la base des expériences terrain comme étant le minimum pour s'assurer qu'une personne maîtrise un geste technique. Dans la mesure du possible, des animaux issus d'autres procédures classées en légère ou modérée pourront être utilisés pour ces formations. Aucun animal ayant subi une procédure sévère ou ne présentant pas un bon état général ne pourra être utilisé pour la formation.

Raffinement : Une formation théorique est dispensée à l'arrivée des personnes avec du texte et un support visuel

15278 La carcinose péritonéale est une pathologie de très mauvais pronostic au cours de laquelle une multitude de métastases se développent dans la cavité péritonéale. Ces lésions sont la cause principale de morbidité et de mortalité chez les patients atteints de cancer colorectal, ovarien, et de l'estomac notamment car les chirurgies et chimiothérapies sont peu efficaces. Cependant, la façon dont ces tumeurs apparaissent et acquièrent des phénotypes résistants demeure inconnue. Pour répondre à cette question, nous souhaitons développer des modèles tumoraux cellulaires (sphéroïdes) et animaux dérivés de tumeurs de patients afin de reproduire l'hétérogénéité biologique de manière pertinente. Ces modèles seront utilisés pour mieux comprendre la reprogrammation épigénétique en réponse du microenvironnement tumoral à travers l'analyse du génome, de l'épigénome, et des voies de transduction du signal. De plus, nous allons suivre les évolutions cellulaires afin de comprendre si cette hétérogénéité persiste dans ces modèles de carcinose péritonéale.

Le but de cette étude est de comprendre précisément comment les carcinoses péritonéales se forment chez différents patients, à partir de différents sous types tumoraux. Cette compréhension nous permettra de développer de nouveaux traitements, plus efficaces, et ainsi d'améliorer la qualité de vie des patients et leur survie.

Dans ce cadre, les souris nude immunodéficientes permettent de développer des modèles tumoraux humains sans phénomène de rejet. Les souris seront hébergées dans un environnement contrôlé dépourvu de germes pathogènes qui permet qu'elles ne souffrent pas de leur défaut d'immunité. Les souris seront surveillées quotidiennement, ce qui nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

Les souris seront utilisées pour fournir des tissus utilisés lors de culture de sphéroïdes (culture cellulaire en 3D) et limiter ainsi l'emploi de nombreux animaux les souris assureront (1) expansion de la tumeur *in vivo* et (2) de la matière première pour les sphéroïdes.

Dans ce projet nous utiliserons 300 souris Nude correspondant au nombre minimum d'animaux nécessaires pour une étude fiable des différents résultats, conformément à la règle des 3R

Remplacer/réduire Les tests *in vitro* sur sphéroïdes (dont la matière première est multipliée chez la souris *in vivo*) vont permettre de réduire le nombre de souris tout en obtenant des résultats pertinents.

Raffiner Les animaux sont hébergés en groupes sociaux, dans un environnement contrôlé dépourvu de pathogènes. La croissance des tumeurs sous cutanées n'entraîne pas de gêne de mobilité et sera suivie par mesure au pied à coulisse. De plus, lors de l'expérimentation, tout sera mis en place pour limiter la douleur infligée à l'animal grâce à l'utilisation de l'anesthésie sur tapis chauffant et grâce à l'utilisation d'anti-douleur pour les procédures qui le nécessite. Le suivi quotidien des animaux garantira leur bien-être, et nous permettront d'intervenir immédiatement de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

15279 La malnutrition chronique chez l'enfant est un problème majeur de santé publique dans les pays en développement, touchant aujourd'hui plus de 150 millions d'enfants dans le monde. Les conséquences à long terme sont particulièrement délétères, notamment marquées par un retard de croissance ainsi que des déficits musculaires qui persistent à l'âge adulte. De nombreuses études suggèrent que les macronutriments critiques dans cette période de la vie sont les protéines. Une alimentation appauvrie en protéines récapitule notamment le retard de croissance chez le rongeur. Des études récentes suggèrent un lien fort entre composition du microbiote intestinal et régime nutritionnel. En particulier, une intervention probiotique chez le rongeur dans un contexte de malnutrition permet de compenser partiellement le retard de croissance chez le juvénile.

L'objectif de cette étude est d'étudier l'effet d'un probiotique sur le développement des muscles striés squelettiques et cardiaque dans un contexte de malnutrition protéique. Il s'agira notamment de nourrir des souris avec un régime appauvri en protéines afin de comprendre l'effet de la malnutrition sur le développement des muscles. Nous faisons l'hypothèse qu'une intervention probiotique chez les individus juvéniles permettra de restaurer partiellement les déficits observés dans le contexte de malnutrition. Cette étude permettra donc l'établissement d'un modèle préclinique ouvrant la porte à de possibles visées thérapeutiques chez l'Homme.

Le projet a été conçu pour respecter la règle des 3R : raffiner, réduire, remplacer. En effet, le nombre d'animaux et de groupes a été réduit au maximum sans toutefois mettre en péril une interprétation statistique des résultats. Cette étude implique une réponse intégrée au niveau de l'organisme (interactions nutrition/microbiote), ce qui justifie une étude chez l'animal. Les procédures répondront aussi à ces exigences avec, en plus, la mise en place de points limites bien définis et suffisamment précoces et prédictifs pour prévenir tout stress et toute douleurs de l'animal. Les conditions d'hébergement, les soins et les procédures seront réalisées par du personnel qualifié. Il s'agit d'une étude sur 160 souris portant sur 5 ans, en raison de la durée des régimes et du nombre de procédures expérimentales testées.

15280 La craniectomie décompressive (CD) est une procédure chirurgicale consistant à enlever une grande partie de l'os de la voûte crânienne. Les CD sont utilisés en médecine dans diverses situations pathologiques à l'origine d'un œdème cérébral pour diminuer la pression intracrânienne, et ainsi éviter les lésions cérébrales secondaires à une hypertension intracrânienne (HTIC).

Dans les semaines ou mois qui suivent la procédure de craniectomie, l'œdème cérébral va se résorber, rendant inutile le maintien de la CD. Il est alors réalisé une procédure de cranioplastie, consistant à remettre en place le volet osseux. Cependant, même si la réalisation d'une CD permet de sauver la vie des patients, cette procédure est loin d'être dénué d'effets secondaires. On sait notamment que suite à une CD, il apparaît quelques semaines après la procédure une altération du métabolisme et une diminution du débit sanguin cérébral en regard de la craniectomie. De plus, le délai optimal de réalisation de la cranioplastie n'est pour l'instant pas connu. Elle est en général réalisée entre 1 et 6 mois après la chirurgie de CD. Des données sur les conséquences de la CD et de la cranioplastie sur la physiologie cérébrale sont donc nécessaires. Cela pourrait notamment permettre de mieux définir la fenêtre optimale de réalisation de la cranioplastie.

Le système glymphatique correspond à la circulation dans le parenchyme cérébral du liquide cérébro-spinal (LCS). Le LCS va nettoyer l'interstitium cérébral de ses déchets, il s'agit donc du

système lymphatique du cerveau. Or le fonctionnement du système glymphatique est dépendant de la pulsativité artérielle. Or l'absence de l'os au niveau de la voûte crânienne après une CD va entraîner une perturbation de transmission des ondes de pression intracrânienne, susceptible de perturber le fonctionnement du système glymphatique.

Nous souhaitons donc évaluer l'impact de la craniectomie décompressive sur le fonctionnement du système glymphatique, et l'impact de la cranioplastie sur ce même système. Les retombées attendues sont essentiellement marquées par une meilleure définition de la fenêtre temporelle de réalisation de la cranioplastie chez les patients opérés d'une CD.

Nous réaliserons des CD à des souris Swiss adultes, sous anesthésie générale et analgésie adaptée, ainsi que des cranioplasties. Nous évaluerons ensuite la circulation du LCS dans le parenchyme en injectant un traceur dans le LCS, puis en réalisant des examens qui sont l'imagerie en résonance magnétique (IRM) et l'imagerie en proche infrarouge (NIRF). L'évaluation du système glymphatique sera réalisée précocement et tardivement, pour évaluer l'évolution dans le temps du système glymphatique après une CD.

Parmi les différents modèles in-vivo existants, la souris est actuellement la seule espèce animale chez qui le système glymphatique a été étudié. Dans ce contexte, ce modèle n'est pas remplaçable et s'avère même indispensable pour mener à bien ce projet.

Le nombre des souris nécessaire a été déterminé au moyen des tests statistiques se basant sur les résultats de nos expériences et sur ceux de publications antérieures en vue d'atteindre la significativité avec le minimum d'animaux. Suivant le principe de réduction, le nombre d'animaux prévu est de 60.

Enfin, le bien-être des animaux sera suivi bi-quotidiennement par du personnel formé, 5j/7 et quotidiennement pendant les WE et jours fériés. Ils seront hébergés dans des cages standards aux normes européennes. Les principes éthiques et les standards de raffinement sont utilisés de la naissance à la mort de l'animal. Les personnes conduisant les expériences sont formées et expérimentées.

15281 But du projet : la recherche appliquée et translationnelle

L'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) est une sentinelle de la fluidité du compartiment vasculaire. Ainsi, l'injection intraveineuse de tPA recombinant a révolutionné la prise en charge des patients victimes d'accident vasculaire ischémique (AVC). Mais la littérature (clinique et pré-clinique) suggère que le tPA vasculaire pourrait mettre en danger les cellules nerveuses et de l'interface sang/cerveau, dont l'intégrité est déjà compromise par l'AVC. En conditions physiologiques, le tPA vasculaire pourrait aussi contribuer aux réponses vasculaires cérébrales (couplage neurovasculaire) et à diverses fonctions cérébrales, comme le comportement. Mais les éléments en faveur d'un rôle clef du tPA sanguin dans la physiopathologie cérébrovasculaire doivent être confortés, car les techniques utilisées jusqu'ici sont critiquables. Aucun outil n'a encore permis de sélectivement éliminer le tPA circulant sans affecter le tPA des autres compartiments de l'organisme. Notre objectif est de mettre en place une parabiose entre une souris entièrement déficiente en tPA (tPANULL) et une souris sauvage (tPAWT). Nous émettons l'hypothèse que le partage de circulation sanguine ramènera les taux circulants de tPA à des niveaux physiologiques chez la souris tPANULL, sans affecter les autres compartiments de l'organisme. La parabiose est une jonction chirurgicale entre deux individus de même fond génétique (afin de limiter les réactions immunitaires), qui permet d'étudier les systèmes circulatoires partagés. C'est un modèle performant, qui a notamment fait ses preuves dans l'étude de la communication hormonale, le rôle du rein dans l'hypertension ou la migration de cellules souches hématopoïétiques. Ce modèle de parabiose devrait donc nous permettre de savoir si les effets secondaires du tPA, qui limitent son bénéfice global en clinique, sont directement liés à un effet dans le sang ou dans le parenchyme cérébral. Répondre à cette question permettra de cibler plus efficacement les améliorations nécessaires sur la molécule pour augmenter le bénéfice aux patients.

Cette étude basée sur l'expérimentation animale prend en compte le bien-être animal et les pratiques éthiques, et répond à la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner).

- La souris est le modèle présentant le meilleur compromis entre pertinence et sensibilité. La souris est l'espèce animale dont l'interface entre le système vasculaire et le système nerveux a été la plus étudiée. Les mécanismes en sont donc globalement établis, ce qui nous permettra d'interpréter nos résultats de manière fiable. L'ensemble des acquis et des connaissances dont nous disposons rend cette espèce particulièrement intéressante dans le cadre de notre étude.

- Nous utiliserons le nombre minimal d'animaux (calcul de puissance statistique et/ou acquis de nos expériences) afin de souscrire au principe de réduction. Cette étude nécessitera néanmoins 176 souris (mâles, 8 semaines, souches tPAWT ou tPANULL) pour être menée à bien.

- Afin de souscrire au principe de raffinement, les animaux seront anesthésiés durant chaque procédure chirurgicale en association avec une couverture analgésique adéquate. Leur bien-être sera suivi 2 fois par jour par du personnel formé, 7j/7 y compris les WE et jours fériés. Ils seront hébergés dans des cages aux normes européennes. Une attention particulière sera portée à l'environnement de la cage (enrichissement pour nidification, accès facilité à la nourriture et à la boisson) et au bien-être de chaque « couple » avant et après la parabiose (par exemple, habitude inter-congénères la plus précoce possible). Les principes éthiques et les standards de raffinement seront utilisés jusqu'à la mise à mort de l'animal.

Mots clefs activateur tissulaire du plasminogène, thrombolyse, AVC, hémodynamique

15282 La dystrophie myotonique de type 1 (DM1) est une des maladies neuromusculaires les plus fréquentes chez l'adulte. Elle est caractérisée par une myotonie, une faiblesse musculaire progressive, des troubles cardiaques ainsi que cognitifs. La DM1 est causée par l'expansion de répétitions CTG dans la partie 3' non-codante du gène DMPK (DM Protein Kinase). Les ARN DMPK mutés contenant des répétitions CUG forment des agrégats nucléaires qui séquestrent des protéines de la famille MBNL et conduisent ultimement, à des symptômes cliniques. La famille des protéines MBNL est composée de MBNL1, MBNL2 et MBNL3. MBNL1 est majoritairement exprimée dans le tissu musculaire squelettique, cardiaque et le cerveau, MBNL2 est principalement retrouvé dans le cerveau. Alors que la fonction de MBNL1 et MBNL2 au niveau du muscle squelettique et du cerveau est extensivement étudié à ce jour, leurs rôles au niveau la moelle épinière et plus particulièrement dans les motoneurones ne sont pas connus. Les motoneurones vont innerver le muscle squelettique et commander sa contraction. L'objectif du projet est de déterminer *in vivo* la contribution de la perte de fonction de MBNL1 et MBNL2 spécifiquement dans les motoneurones sur la fonction du muscle squelettique et sa contribution aux anomalies musculaires observés chez les patients DM1. Pour ce projet, nous avons développé une lignée de souris triple-transgénique (Hb9-MBNL1/2) permettant l'invalidation conditionnelle de Mbnl1 et Mbnl2 spécifiquement dans les motoneurones (MN-dKO). Pour cela, l'expression de l'enzyme Cre recombinase, permettant l'invalidation de l'expression des protéines MBNL, est placée sous le contrôle d'un promoteur spécifique des motoneurones, Hb9. Les souris Hb9Cre homozygotes (Hb9Cre+/+) sont létales à l'état embryonnaires et les souris homozygotes Mbnl1-/- présentent des défauts de fertilités. Pour cela, afin de générer nos souris d'intérêt, des souris hétérozygotes ou sauvage pour le gène Hb9Cre (Hb9Cre+/- Hb9Cre-/-) hétérozygote pour Mbnl1 (Mbnl1+/-) et homozygotes pour Mbnl2 (Mbnl2c/c) seront accouplées. Ces souris à l'état hétérozygotes ne présentent aucun phénotype dommageable, cependant les souris homozygotes Mbnl1-/-, ainsi que les souris MN-dKO développent une myotonie à l'âge adulte conduisant à des défauts de la motricité chez ces souris. Nos premières observations ne montrent aucun signe d'inconfort, de douleurs ou de problème d'accès à la nourriture. Toutefois, si des modifications importantes de comportement, laissant supposer une douleur excessive (retrait ou vocalisation excessive à la manipulation, prostration ou agitation anormale, perte de poids, déshydratation) sont observées, elles seront considérées comme critères d'arrêt et conduiront à l'euthanasie des animaux concernés. Les souris invalidées pour Mbnl2 seul ne présentent aucun phénotype délétère.

Au total, l'ensemble de ce projet de recherche d'une durée de 5 ans nécessitera l'utilisation de 400 souris présentant un phénotype dommageable, soit 200 souris MN-dKO et 200 invalidées pour Mbnl1 seul.

Les procédures décrites prévoient l'utilisation de souris en adéquation avec la règle des 3R.

1- Remplacer des modèles cellulaires *in vitro* pour l'étude des motoneurons dans la DM1 ont déjà été développés. Cependant l'évaluation de l'impact de la perte de fonction de Mbnl1 et Mbnl2 spécifiquement dans les motoneurons sur la fonction musculaire nécessite des modèles *in vivo* de souris reproduisant ce phénomène

2- Réduire Afin de réduire et d'optimiser le nombre d'animaux, différentes évaluations phénotypiques se feront au cours de la vie des souris et toutes les souris issues des différentes portées seront analysées (Les procédures expérimentales utilisées à ces fins seront décrites dans des demandes d'autorisations spécifiques, celle-ci concernant uniquement l'entretien de la lignée en animalerie et le prélèvement d'organes pour les projets de recherche) ou utilisées pour le maintien de la lignée en animalerie.

3- Raffiner toutes les précautions seront prises afin de réduire à son maximum le stress et la souffrance animale. L'entretien des souris est assuré par du personnel qualifié et le bien-être des animaux sera amélioré par la mise en place d'un enrichissement de milieu par addition de nids dans les cages.

15283 Ce projet vise à caractériser le rôle des macrophages périvasculaires (Perivascular Macrophages, PVM) dans l'inflammation cérébrale. Notre hypothèse, basée sur les études précédentes et sur la localisation privilégiée des PVM à l'interface entre le compartiment vasculaire et le parenchyme cérébral, est que les PVM pourraient jouer un rôle déterminant dans la réaction inflammatoire intervenant dans de nombreuses pathologies. Pour ceci, nous disposons aujourd'hui au sein de notre laboratoire des techniques permettant d'éliminer spécifiquement les PVM dans les espaces périvasculaires et de les marquer spécifiquement par fluorescence.

Dans cette étude, nous allons :

- (i) Etudier l'impact de la méthode de déplétion des PVM « per se » sur l'inflammation cérébrale.
- (ii) Etudier le rôle des PVM dans la neuroinflammation dans le cadre d'une infection cérébrale.
- (iii) Etudier le rôle des PVM dans la neuroinflammation dans le cadre d'un accident vasculaire cérébral.
- (iv) Etudier le rôle des PVM dans la neuroinflammation dans le cadre d'un accident vasculaire cérébral avec un facteur de comorbidité le vieillissement.

Cette étude basée sur l'expérimentation animale prend en compte le bien-être animal et les pratiques éthiques, et prend en compte la règle des 3 R (remplacer, réduire, raffiner) comme décrit ci-dessous.

Nous avons sélectionné le modèle présentant le meilleur compromis entre pertinence scientifique et sensibilité de l'espèce. La souris est avec le rat l'espèce animale la plus étudiée dans le domaine de l'inflammation cérébrale. La physiopathologie est donc globalement établie, ce qui nous permettra d'interpréter nos résultats de manière fiable. L'ensemble des acquis et des connaissances dont nous disposons rend cette espèce particulièrement intéressante dans le cadre de notre étude.

Nous utiliserons le nombre minimal d'animaux afin de souscrire au principe de réduction. Le nombre d'animaux utilisé est déterminé en fonction de la spécificité/sensibilité des méthodes utilisées, et/ou selon nos travaux précédents ayant utilisé et validé une analyse de puissance. 392 souris seront nécessaires pour réaliser les 4 étapes, et l'utilisation d'outils d'imagerie non invasive permettant un suivi longitudinal permet de réduire significativement le nombre d'animaux utilisés.

Afin de souscrire au principe de raffinement, les animaux seront anesthésiés durant chaque procédure. La douleur suite à l'injection de clodronate est considérée comme légère à modérée : en effet, les observations initiales montrent que les animaux se déplacent et s'alimentent normalement, prennent bien soin de leur pelage, n'émettent aucun son et ne présentent aucun « sickness behavior syndrome ».

Le bien-être des animaux sera suivi par du personnel formé bi-quotidiennement 5j/7 et quotidiennement pendant les WE et jours fériés. Les animaux seront hébergés dans des cages

standards aux normes européennes. Les principes éthiques et les standards de raffinement seront utilisés jusqu'à la mise à mort de l'animal.

15284 Chaque année de nouveaux étudiants, techniciens, ingénieurs et chercheurs arrivent dans les établissements utilisateurs. N'étant pas tous formés aux gestes techniques, il est important de proposer à ces utilisateurs une formation leur permettant de pouvoir acquérir les gestes techniques de bases sur la souris (contention des animaux sans stress, injections, prélèvements sanguins, anesthésies...). Le but de ce projet est de proposer une formation d'une demi-journée, encadrée par deux formateurs compétent et titulaire du Niveau 1 ou 2 en expérimentation animale. Cette demi-journée comptera pour les 3 jours/6 ans de formation continue nécessaires à l'acquisition et à la validation des compétences des personnels des établissements utilisateurs selon la directive européenne 2010/63/UE et la réglementation française. La formation proposée permet aux utilisateurs de maîtriser les gestes techniques qu'ils seront amenés à réaliser dans le cadre des protocoles qu'ils devront mettre en œuvre. L'utilisation d'animaux est donc indispensable.

Les gestes de base en expérimentation qui seront appris au cours de cette formation seront réalisés après une bonne maîtrise de la contention des animaux sans stress. Le nombre d'animaux utilisé sera adapté à la demande d'acquisition de gestes techniques mais n'excédera jamais 10 par personne. Ce nombre est réduit au maximum tout en permettant la répétition des actes techniques sans mettre en péril le bien-être de l'animal. Des points limites prédictifs d'un échec de la maîtrise du geste ont été définis afin d'éviter toute souffrance de l'animal. Si ces points limites sont atteints, cela conduira à sa mise à mort immédiate de l'animal par le formateur. La majorité des gestes techniques seront réalisés sous anesthésie générale ou locale. Les souris utilisées dans ces procédures sont toutes des souris de réforme adultes, non incluses dans des projets (génotype non relevant ou sexe non compatible avec le projet) et ne présentant pas de phénotype dommageable. Le nombre maximal de souris sera de 1800 sur cinq ans.

15285 A l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement curatif de la maladie d'Alzheimer (MA), maladie dont la prévalence est amenée à augmenter au cours des prochaines décennies du fait du vieillissement de la population. Mieux connaître les mécanismes impliqués dans la maladie permettra d'identifier de nouvelles possibilités de traitements et de caractériser de nouveaux marqueurs diagnostiques afin d'améliorer la prise en charge des patients, ce qui est un enjeu crucial de santé publique. Cette maladie se caractérise par une neurodégénérescence progressive, due en partie à l'accumulation de formes anormales et toxiques de la protéine Tau dans le cerveau. L'inflammation cérébrale est une composante essentielle de la MA. Elle est due à l'activation de différents types de cellules immunitaires cérébrales et jouerait un rôle crucial dans la progression de la maladie. Lorsque cette inflammation survient en période périnatale, elle pourrait favoriser l'émergence de la MA plus tard au cours de la vie. Pour étudier ce phénomène, nous utiliserons un modèle développé chez la souris d'inflammation périnatale (reproduisant la pathologie humaine du syndrome inflammatoire précoce) qui sera combiné à l'âge adulte à un modèle d'accumulation pathologique de la protéine Tau, composante majeure de la MA. Ces expériences permettront de vérifier si des épisodes inflammatoires transitoires, par exemple dus à des infections, peuvent entraîner l'aggravation d'une tauopathie survenant ultérieurement.

L'objectif de ce projet est de faire progresser nos connaissances dans la physiopathologie de la MA, et en particulier dans les relations entre le processus de tauopathie et la neuroinflammation. Il sera conduit sur deux sites différents par deux partenaires distincts, le premier partenaire maîtrisant le modèle d'inflammation périnatale, et le second partenaire maîtrisant le modèle d'accumulation de la protéine Tau. Entre ces deux phases expérimentales, les animaux seront transférés après sevrage des locaux du premier partenaire à ceux du second, par le biais d'un transporteur agréé.

Les expériences seront réalisées sur 302 souris sur une période de 5 ans. La bonne reproductibilité de ce modèle expérimental permet de limiter le nombre d'animaux par groupe nécessaire à la réalisation d'analyses statistiques. Ce modèle expérimental est de sévérité modérée et n'entraîne pas de phénotype dommageable chez la souris. La mise en place de points limites ainsi que

l'observation quotidienne du comportement des animaux permettront d'identifier et de limiter toute souffrance et douleur.

Cette étude prend en compte la réglementation des 3R

Remplacement Les mécanismes impliqués dans l'inflammation périnatale et la MA mettent en jeu l'interaction de plusieurs types cellulaires au cours du développement cérébral qu'il est impossible de reproduire *in vitro*.

Réduction Le nombre d'animaux estimé et les tests statistiques utilisés sont basés sur notre expérience pour ce type d'étude. Ce nombre minimum nous permettra d'être certain de répondre aux questions scientifiques de ce projet. L'analyse statistique de nos données nécessite n=36 animaux par groupe pour mettre en évidence une différence significative (total= 302).

Raffinement Les injections réalisées pour induire la neuroinflammation se feront en intra-péritonéale en période périnatale. Les animaux seront remis dans leur nid et on vérifiera quotidiennement jusqu'au sevrage que le retour au sein du nid se fait bien selon des critères préétablis. Après sevrage, les animaux seront hébergés en groupe en milieu enrichi pour minimiser leur stress. L'induction de la tauopathie se fera à l'âge adulte par chirurgie stéréotaxique, sous protocoles d'anesthésie et d'analgésie définis et validés par une équipe de vétérinaire. A la suite de la chirurgie, les animaux seront surveillés jusqu'à réveil complet. L'application de critères d'arrêts standards en élevage et spécifiques aux souches étudiées, associés au suivi quotidien des animaux hébergés en groupe dans un milieu enrichi, permettent de garantir le bien-être des animaux. A la fin de l'étude les animaux seront euthanasiés selon les méthodes réglementaires.

15286 L'insuffisance rénale chronique (IRC) est une maladie dont souffre environ 10% de la population occidentale. Bien qu'elle puisse être secondaire à de nombreuses pathologies différentes (majoritairement l'hypertension et le diabète, mais également de nombreuses pathologies rares), les complications de l'IRC lui sont propres, et communes à tous les patients.

En effet, la perte de fonction rénale engendre l'accumulation de nombreuses toxines normalement éliminées par les reins. Cette accumulation de toxines entraîne de nombreuses complications, principalement métaboliques.

Les patients IRC se caractérisent également par un système immunitaire très particulier d'un côté ils présentent une hyperactivation du système immunitaire, principalement sur les cellules de l'immunité innée (qui sont impliquées dans la défense non spécifique contre des pathogènes) responsable d'une inflammation chronique à bas bruit engendrant des complications cardiovasculaires (athérosclérose, etc).

D'un autre côté, ils présentent un profond déficit immunitaire, responsable d'un défaut de réponse vaccinale, et d'une importante augmentation du nombre d'infections. Ce déficit immunitaire semble être prédominant sur les cellules de l'immunité adaptative (responsable d'une défense spécifique contre un pathogène, et autorisant une mémoire immunologique contre ce pathogène), et plus spécifiquement sur l'immunité humorale (réponse permettant la production d'anticorps contre un pathogène suite à l'activation d'un lymphocyte B). Les mécanismes physiopathologiques par lesquels l'IRC induit ce déficit humoral restent mal compris.

C'est donc sur la compréhension du déficit immunitaire humoral associé à l'insuffisance rénale chronique que se focalise notre projet de recherche.

Ce projet nécessite l'emploi de modèles expérimentaux *in vivo*. En effet, la complexité à la fois des mécanismes immunologiques entraînant une réponse humorale, et des dysfonctions associées à l'IRC ne peuvent être appréhendés par des modèles *in vitro* seuls. En parallèle, nous réalisons des expérimentations *in vitro* afin de comprendre l'effet spécifique de certaines toxines sur les cellules de l'immunité humorale, mais la complexité de cette réponse ne permet pas de s'affranchir du modèle *in vivo*.

Les animaux seront soumis à certaines injections permettant de mimer une réponse humorale, à un régime induisant l'IRC, et à différents prélèvements sanguins. Les dommages causés aux animaux sont minimes les injections n'entraînent pas de modification phénotypique particulière. Le

régime IRC n'entraîne qu'une discrète perte de poids due à une modification de l'appétence alimentaire des animaux, qui sera surveillée, et l'animal mis à mort si celle-ci est trop importante. Enfin, et à visée de raffinement, les prélèvements sanguins seront réalisés sous anesthésie générale.

Nous aurons besoin pour ce projet de 116 souris au maximum. A visée de réduction, ce nombre a été calculé par des méthodes biostatistiques et correspond au nombre de souris nécessaire pour répondre aux questions posées. Les avancées scientifiques en matière d'analyse de la réponse humorale ainsi que sur la mise au point de modèles d'IRC nous permet de limiter au maximum les expériences de mise au point.

Par soucis de réduction également, les animaux seront utilisés pour étudier d'autres réponses particulièrement importantes dans l'immunodépression de l'IRC, notamment les réponses lymphocytaires T.

15287 La matrice extracellulaire est un réseau complexe de molécules qui entoure les cellules. Ce réseau de molécules sert non seulement de support aux cellules, mais participe également à l'agencement des cellules en tissus et leur confère des propriétés mécaniques appropriées (comme une résistance mécanique). Outre les propriétés physiques, les molécules de la matrice extracellulaire régulent le comportement des cellules en interagissant directement avec elles ou en modulant la communication entre les cellules.

Les patients atteints de syndrome d'Ehlers-Danlos montrent une hyperlaxité de la peau, une hypermobilité des articulations et une grande fragilité tissulaire, dues à des altérations des propriétés biomécaniques des tissus conjonctifs provoquées par des mutations dans certains gènes codant des protéines de la matrice extracellulaire. Cette étude s'intéresse à une protéine de la matrice extracellulaire dont la déficience conduit à un sous-type du syndrome d'Ehlers-Danlos qui se manifeste également par une faiblesse musculaire, des neuropathies et une grande fragilité vasculaire (formation anormalement fréquente d'ecchymoses, par exemple).

L'objectif du projet déposé est donc d'analyser finement les réponses fonctionnelles des microvaisseaux de la peau en absence de cette protéine d'intérêt, grâce à des souris génétiquement modifiées pour cette protéine et qui récapitulent certaines manifestations cliniques du syndrome d'Ehlers-Danlos rencontrées chez l'Homme. Ces manifestations ont un impact clinique léger sur les souris, sans atteinte notable sur leur mobilité, leur reproduction et leur alimentation.

Comme la vasodilatation des vaisseaux de la peau est contrôlée par le système nerveux sensoriel, des tests comportementaux seront effectués sur les souris vigiles pour appréhender le bon fonctionnement du système nerveux sensoriel. Plus particulièrement, nous déterminerons les délais de réponse à un stress thermique ou un stress mécanique appliqué chez ces souris vigiles. Les stressés thermiques et mécaniques seront appliqués sur la queue et les pattes des souris et nous mesurerons leur délai de réponse face à ces conditions inconfortables. Les stressés thermiques et mécaniques seront appliqués à des seuils qui provoquent seulement un inconfort et non une douleur chez les souris.

Deux jours plus tard, ces mêmes souris seront ensuite anesthésiées pour une courte durée (30 minutes) afin d'effectuer des mesures non invasives pour caractériser les propriétés biomécaniques et vasculaires de la peau. Les techniques utilisées sont indolores elles sont également utilisées chez l'homme.

Afin de limiter le nombre d'animaux, deux réponses vasculaires à deux stimuli différents seront effectuées en parallèle lors d'une même anesthésie.

Les souris ne percevront aucune douleur au cours des différentes manipulations. Une fois les mesures effectuées, les souris seront placées dans une cage de réveil et maintenues au chaud (couveuse chauffée ou plaque chauffante) jusqu'à leur réveil complet et seront mises à mort une semaine plus tard. Afin de respecter la règle des 3R, différents vaisseaux sanguins seront collectés sur les animaux mis à mort. Ces échantillons vasculaires permettront (1) des études fonctionnelles de réponses vasculaires ex vivo sur des vaisseaux isolés et (2) des analyses histologiques approfondies.

Notre projet respecte la règle des 3R. En effet, la réactivité vasculaire cutanée repose sur une interaction fonctionnelle des systèmes nerveux et vasculaires nécessitant une approche *in vivo*. Aucune méthode alternative ne peut donc se substituer à l'utilisation des animaux pour la réalisation de notre projet car il requiert une approche intégrée.

Le nombre de souris nécessaire à nos travaux a été réduit au minimum sans compromettre l'interprétation statistique de nos résultats. Les souris seront suivies avec un soin particulier, elles seront observées 3 fois par semaine et pesées une fois par semaine. Les points limites sont clairement définis, afin de détecter précocement tout signe de souffrance.

Ce projet concernera 90 souris au maximum.

15288 La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) est une pneumopathie interstitielle fibrosante caractérisée par l'accumulation de tissu conjonctif dans les poumons conduisant à une insuffisance respiratoire restrictive d'évolution fatale. En l'absence de traitement efficace, la médiane de survie à partir du diagnostic de FPI est d'environ 3 ans avec une évolution de la maladie variable selon les patients (lentement progressif, avec des épisodes d'exacerbation ponctuels ou plus rarement rapidement progressif et une mortalité élevée). Les premiers résultats obtenus sur un modèle murin de pathologie pulmonaire aiguë induite à la bléomycine suggèrent également une modification de la mécanique ventilatoire affectant les échanges gazeux au niveau pulmonaire se traduisant par une diminution de la saturation. Ces résultats sont conformes à ce qui est observés dans les pathologies pulmonaires interstitielles pour lesquelles on observe une dyspnée, une atteinte des régulations ventilatoires caractérisée par une faible valeur de capacité vitale forcée associée avec une augmentation de la fréquence respiratoire et une diminution du volume courant. Il a également été rapporté une diminution de la réponse ventilatoire à l'hypercapnie chez des patients souffrant de fibrose pulmonaire. De plus, l'érythropoïétine (EPO) a été démontrée comme ayant un effet protecteur dans différents organes (rétine, reins, testicules...) en ayant un effet anti-inflammatoire, anti-oxydatif, anti-apoptotique. Nous émettons l'hypothèse que l'EPO pourrait avoir un effet modulateur dans ces processus en jouant sur le stress oxydant et/ou sur l'inflammation des cellules épithéliales alvéolaires (CEA). En effet, la présence de cette EPO au niveau pulmonaire suggère un effet protecteur potentiel de cette dernière. De manière intéressante, des données récentes du laboratoire suggèrent que l'EPO a une action anti-oxydante sur des CEA soumises à l'hypoxie continue. D'autre part, nos premiers résultats obtenus sur un modèle murin sous exprimant l'EPO (souris Epo-TAg) démontrent un stress oxydant plus important et une production des espèces réactives de l'oxygène accrue au niveau pulmonaire chez les souris déficientes en EPO. Nos résultats suggèrent également une tendance à une Transition Epithélio-Mesenchymateuse (TEM) plus importante chez nos souris déficientes en EPO. Cependant, l'effet de l'Hypoxie chronique ou intermittente sur la production pulmonaire d'EPO, et le rôle potentiel de l'EPO dans ce contexte ne sont pas connus. Dans notre étude, nous envisageons d'étudier l'effet de l'EPO au niveau pulmonaire en utilisant un modèle murin EPO déficient.

Ce projet nécessite l'utilisation de 192 animaux sur 2 ans et se fera en accord avec la règle des 3R. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, ces derniers seront réutilisés dans d'autres procédures expérimentales, il est à noter que seules les expérimentations primordiales à l'avancé du projet seront réalisées. Les différentes procédures seront réalisées dans le respect total des règles du raffinement, les animaux suivront un protocole favorisant leur habitude afin de diminuer au maximum leur état de stress. Les parties des projets réalisables *in vitro* seront appliquées.

Nous veillerons à réduire le nombre d'animaux pour ce projet, les parties des projets réalisables *in vitro* seront appliquées. Les différentes procédures seront réalisées dans le respect total des règles du raffinement.

15289 Le cortex cérébral est composé, chez l'adulte de six couches de neurones. L'architecture complexe de ce réseau neuronal reflète de la complexité de sa mise en place et de l'importance d'une régulation contrôlée pour chaque neurone. En effet, la formation du cortex, ou corticogenèse est un processus hautement régulé composé de plusieurs étapes distinctes telles que la prolifération, la différenciation et la migration cellulaire. De plus, des altérations au cours des diverses étapes de la

corticogénèse vont pouvoir entraîner l'apparition de pathologies neuro-développementales comme l'épilepsie, la schizophrénie ou le retard mental.

De nombreuses études ont mis en évidence l'implication de l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) dans les processus cognitifs et émotionnels tels que l'apprentissage, l'anxiété et dans la survenue des crises d'épilepsie. Les études menées sur son effet au cours du développement cérébral et plus précisément sur la migration neuronale et la pousse neuritique sont restreintes au cervelet et l'influence du tPA sur la corticogénèse n'a pas encore été étudiée.

Le but de ce projet est donc de mieux comprendre l'implication du tPA au cours de la corticogénèse. Pour ce faire, nous utiliserons un modèle d'électroporation *in utero* combinée à l'utilisation de différents vecteurs chez des souris sauvages et déficientes en tPA de manière constitutive (tPA-Knock-Out) ou conditionnelle (tPAlox/lox). Cette technique nous permettra, dans une région corticale précise, de surexprimer ou d'invalider l'expression d'un gène à un moment précis du développement et grâce à l'utilisation de protéines fluorescentes de pouvoir suivre sa localisation subcellulaire au sein des neurones en migration. Afin de mieux comprendre les mécanismes d'action du tPA au cours de la corticogénèse et de ses incidences à l'âge adulte, les animaux seront électroporés dans 12 conditions différentes (souches, et plasmides) puis récupérés à 10 différents stades pré- et post-nataux et des analyses *in vivo* ou en *ex vivo* par imagerie microscopique seront réalisées.

Cette étude, basée sur l'expérimentation animale, prend en compte le bien-être animal, les pratiques éthiques, et répond à la règle des 3 R (remplacer, réduire, raffiner) comme décrit ci-dessous

Réduire, remplacer La souris est l'espèce animale la plus étudiée dans le domaine du développement cérébral. La communauté scientifique dispose pour ces études d'un modèle animal permettant de suivre la migration des neurones au cours du développement cérébral. L'ensemble des connaissances et des acquis dont nous disposons au laboratoire et dans la littérature grâce à ce modèle rend la souris particulièrement intéressante pour notre étude. Notre projet ne nous permet pas d'utiliser d'autres moyens que l'expérimentation animale.

Avant de procéder à une telle étude, nous nous assurons d'utiliser le nombre minimal d'animaux adéquat pour atteindre le résultat souhaité. Dans ce projet, 1440 souris seront nécessaires pour mieux comprendre l'influence du tPA sur le développement cérébral.

Ainsi, les procédures expérimentales décrites dans ce projet ont un caractère de stricte nécessité et ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau d'information.

Raffiner Les animaux seront anesthésiés durant la chirurgie. La douleur suite à la chirurgie est considérée comme légère voire modérée en effet, l'ensemble des connaissances et des acquis dont nous disposons au laboratoire montre que les animaux se déplacent et s'alimentent normalement, prennent bien soin de leur pelage, n'émettent aucun son et ne présentent aucun « sickness behavior syndrom ». En vue de minimiser la douleur et la détresse, et d'améliorer le bien-être des animaux utilisés dans ces études, des soins particuliers seront appliqués aux conditions d'élevage par rapport à des conditions standards, (animaux hébergés seuls par cage, placement de la nourriture sous forme de bouillie à une hauteur réduite).

Mots clefs développement cérébral électroporation *in utero* activateur tissulaire du plasminogène.

15290 L'adoption généralisée d'un mode de vie de type occidental (surnutrition, malnutrition) est associée à une augmentation inquiétante de la prévalence des maladies métaboliques (obésité, diabète, stéatose hépatique...) nécessitant de chercher et de développer des solutions préventives et thérapeutiques efficaces. Dans ce contexte, l'objectif de ce projet, est de trouver un composé capable de stimuler l'expression et la sécrétion d'une protéine cible, le facteur de croissance des fibroblastes 19 (FGF19), impliquée dans le maintien d'une balance glucidique et lipidique saine. Le FGF19 a notamment démontré son intérêt thérapeutique en diminuant le taux de lipides accumulés dans le foie, en améliorant la sensibilité à l'insuline (prévention du diabète) et en limitant la prise de poids. Sur la base de ces résultats, le FGF19 est désormais considéré comme une cible très

prometteuse pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques des maladies métaboliques.

Le FGF19 étant produit exclusivement par l'intestin, une stratégie d'intervention par des nutriments spécifiques paraît être une voie privilégiée. Ainsi, l'effet de plusieurs composés naturels a été évalué *in vitro* sur cellules intestinales en culture et a permis de mettre en évidence un aliment fonctionnel susceptible d'augmenter la production de FG19. Cependant, cet effet est dépendant de la communication entre les organes, de notre immunité ou encore de notre microbiote (micro-organismes présents dans les intestins). Ainsi l'effet observé *in vitro* doit impérativement être démontré chez l'animal, seul modèle qui permet l'accès à un système biologique intègre et complet.

Pour répondre à ces objectifs, des souris mâles recevront une alimentation standard ou riche en graisses et en sucres sur un temps plus ou moins long (1 ou 20 semaines) afin d'initier ou d'instaurer des perturbations métaboliques permettant de mimer une obésité ainsi qu'un diabète (prise de poids, accumulation de lipides dans le foie, diminution de la sensibilité à l'insuline). Ces souris recevront un traitement comprenant soit l'aliment fonctionnel d'intérêt, soit un agent antidiabétique (qui servira de contrôle positif) soit un placebo. Les souris ayant reçu ce traitement sur une période de 4 semaines subiront un test sanguin permettant de mesurer leur capacité à métaboliser le glucose. A la fin du traitement, des prélèvements finaux de sang et de tissus permettront l'analyse de multiples paramètres physiologiques et métaboliques.

Les questions inhérentes à ce projet ne permettent pas la substitution du modèle animal à un autre modèle. Cependant, en accord avec la règle des 3R, des engagements pour réduire et raffiner au mieux le modèle animal dans ce projet seront suivis. Les souris seront surveillées tous les jours afin d'identifier et de limiter tout risque de souffrance ou de mal-être. Des points limites ont été notifiés et, s'ils sont atteints, permettront de mettre fin à la procédure pour l'animal. Ce protocole expérimental ne constitue pas de double emploi. A notre connaissance, la question scientifique posée ici n'a encore jamais été adressée. Il s'agit d'un projet totalement original et l'élaboration de ce protocole évite toute redondance avec des expérimentations ultérieures. Un total de 680 souris au maximum est prévu dans ce projet sur une période de 5 ans. Ce nombre maximum d'animaux a été estimé nécessaire pour réaliser l'ensemble des analyses, satisfaire les études statistiques et tirer des conclusions permettant de répondre à notre question scientifique. De plus, la procédure n°4 sera uniquement réalisée si les résultats de la procédure n°3 démontrent un effet significatif de l'aliment fonctionnel. Dans le cas où la 4ème et dernière procédure ne serait pas réalisée ce nombre maximum d'animaux serait réduit à 470.

15291 L'hippocampe est une structure corticale impliquée dans de nombreuses fonctions cognitives (processus mnésiques, navigation spatiale, apprentissage). Notre question principale est de comprendre comment le réseau neuronal de l'hippocampe se développe pour assurer ces fonctions cognitives. Nos études permettront de comprendre comment un réseau neuronal se structure au cours d'un développement normal, afin de mieux analyser les dysfonctionnements de ce réseau en condition pathologique telle l'épilepsie du lobe temporal.

Cette étude s'effectuera sur des souris. Le modèle murin permet de tirer des conclusions générales sur l'organisation corticale des mammifères, y compris chez l'homme. Nous appliquerons et adapterons aux nouveau-nés une approche multidisciplinaire que nous avons développée précédemment pour l'adulte regroupant imagerie calcium *in vivo* et *in vitro*, électrophysiologie, optogénétique, neuroanatomie, traitement de données massives, et génétique de la souris. Nous utiliserons plusieurs lignées de souris génétiquement modifiées permettant de cibler et/ou manipuler différentes populations de neurones inhibiteurs ou excitateurs.

Cette approche multidisciplinaire permet d'optimiser le nombre d'animaux engagés (5050) tout en améliorant la qualité des données complexes extraites des expériences, de générer des résultats statistiquement significatifs et de renforcer la vraisemblance des conclusions scientifiques. La conception de ce projet a été articulée pour appliquer au mieux les principes de la règle des 3R. 1) Remplacement : il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode de substitution *in vitro* ou en culture cellulaire pour étudier la mise en place au cours du développement des activités neuronales du réseau hippocampique où informations externes et internes sont impliquées. 2) Réduire : Les

expériences seront réalisées avec un souci permanent de réduction du nombre d'animaux. La méthode utilisée d'imagerie calcium *in vivo* permet l'enregistrement d'un très grand nombre de neurones (plusieurs centaines) par animal, et donc de diminuer le nombre d'animaux utilisés. Une même portée sera utilisée par plusieurs expérimentateurs. Les nouveau-nés non utilisés pour les études développementales seront utilisés plus tard dans le cadre d'études menées chez l'adulte. 3) Raffinement : Le bien-être des animaux, qu'il s'agisse des souris gestantes comme de leur progéniture, sera évalué régulièrement (croissance staturo-pondérale, aspect général, comportement). Une attention particulière sera portée aux nouveau-nés au cours des chirurgies pour réduire douleur et stress (anesthésie générale et locale, tapis chauffant, suivi strict post-chirurgie des nouveau-nés en particulier après leur réintroduction au sein de la portée). Les mères et leur nouveau-nés opérés ou non seront hébergés dans des armoires ventilées, sous environnement contrôlé, dans des cages avec un environnement enrichi d'igloos cartonnés et de mini-rouleaux de papier foisonnant permettant aux femelles de faire des nids.

15292 Un parfait équilibre entre prolifération et mort cellulaire est nécessaire au sein des différents organismes vivants, tels que l'homme, afin de garantir leur bonne santé. Toute dérégulation dans cet équilibre peut être associée à différentes pathologies, et notamment au cancer. L'apoptose est la forme de mort cellulaire la plus étudiée et entraîne l'activation de certaines protéines qui déclenchent la mort de la cellule ciblée. Des travaux scientifiques récents mettent cependant en évidence que les cellules, notamment cancéreuses, peuvent survivre à une activation partielle de l'apoptose, et que celle-ci pourrait de façon contre intuitive stimuler la croissance tumorale. La contribution de l'activation partielle de l'apoptose au cancer est cependant très peu caractérisée. Une meilleure compréhension des mécanismes qui pourraient lui être associés est donc nécessaire afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques (limitation de la formation de métastases, principale cause de mortalité pour les personnes atteintes d'un cancer, mais également de l'apparition de cellules tumorales plus agressives suite à des traitements chimiothérapeutiques, celles-ci pouvant contribuer à la récurrence du cancer).

Dans ce contexte, des cellules cancéreuses (en particulier de mélanome, un cancer très agressif) ont été soumises à différents traitements induisant l'apoptose. Les cellules survivant à l'apoptose ont ensuite été analysées. Il a ainsi pu être mis en évidence que ces cellules étaient caractérisées par l'expression de gènes spécifiques et par une forte augmentation de leur agressivité *in vitro*. La majorité des résultats concernant ce projet ont à l'heure actuelle été obtenus en utilisant plusieurs techniques *in vitro* afin de limiter au maximum l'utilisation inutile d'animaux.

L'objectif de ce projet de recherche fondamentale est désormais de déterminer la significativité de ces résultats en les confirmant dans un modèle de souris, le modèle de référence pour l'étude des capacités métastatiques des cellules cancéreuses. En effet, bien que les expérimentations *in vitro* permettent d'obtenir de nombreuses informations, elles ne permettent pas encore de refléter totalement la complexité des organismes vivants, et donc les différentes étapes que doivent franchir les cellules tumorales pour conduire à la formation de métastases. L'utilisation de modèle *in vivo* reste donc nécessaire pour une validation complète des caractéristiques déjà observées *in vitro*. Afin de réaliser cet objectif, des cellules cancéreuses ayant survécu ou non à l'induction de la mort cellulaire devront être injectées dans des souris. L'apparition de populations cellulaires cancéreuses plus agressives suite à un traitement induisant l'apoptose d'une tumeur primaire ainsi que l'évaluation de la capacité des cellules cancéreuses ayant survécu à l'apoptose à former des métastases seront analysés. Pour ces expériences, la règle des 3R de l'éthique dans l'expérimentation animale sera scrupuleusement respectée. Concernant la réduction, nous réduirons au maximum le nombre d'individus par groupe, sans altérer l'interprétation statistique de nos résultats. Les expériences proposées correspondent de plus uniquement aux expériences essentielles à la bonne conduction de notre projet jusqu'à son terme, et ne concernent aucune expérience exploratoire ou déjà effectuée précédemment par une autre équipe. Le début du projet sera focalisé sur le mélanome, et en fonction des futurs projets, collaborations et financements, l'utilisation de certains modèles pourra être limitée (à choisir entre cancer du sein et du colon). Par ailleurs, pour suivre le développement des métastases, deux méthodologies non invasives

d'imagerie seront employées afin de réduire le nombre d'animaux au maximum (suivi longitudinal) et de raffiner les protocoles. En effet, l'imagerie permet la détection très précoce des lésions métastatiques et l'interprétation des résultats de l'expérience, ce qui permet le déclenchement de la fin de la procédure avant l'apparition de toute souffrance de l'animal. L'imagerie sera effectuée sous anesthésie afin d'éviter tout stress de l'animal.

Plusieurs points limites conduisant à la fin de l'expérimentation ont été clairement définis. La bonne santé des animaux sera vérifiée au minimum 3 fois par semaine par l'expérimentateur.

Au total, 1350 souris sur une période de 5 ans seront nécessaires pour la conduite de ce projet.

15293 Le syndrome néphrotique résulte d'un dysfonctionnement glomérulaire rénal conduisant à une perte massive de protéines dans les urines. Cette altération glomérulaire primaire s'accompagne d'une rétention tubulaire d'eau et de sel conduisant à la formation d'oedèmes et d'ascite qui entravent la vie quotidienne. Nous travaillons depuis plusieurs années à l'élucidation des mécanismes responsables de la rétention hydro-sodée et de la constitution des oedèmes et de l'ascite au cours du syndrome néphrotique afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Ce projet de physiopathologie intégrative ne peut être réalisé que sur un modèle animal présentant une physiologie rénale et vasculaire comparable celle de l'humain. Actuellement il existe un seul modèle animal qui récapitule la plupart des symptômes de la maladie humaine. Il s'agit d'un modèle de rat chez lequel le syndrome néphrotique est induit par une injection intraveineuse unique d'aminonucléoside de puromycine (PAN), un composé induisant aussi un syndrome néphrotique chez l'homme mais pas chez la souris. L'étude de ce modèle animal nous a antérieurement permis d'identifier le site intrarénal de la rétention de sodium ainsi que le canal à sodium responsable. Cependant, ce modèle présente un taux plasmatique d'aldostérone élevé, une caractéristique rare chez les patients néphrotiques. L'administration de PAN à des rats chez lesquels nous avons clampé la concentration circulante d'aldostérone nous a ensuite permis d'identifier un nouveau canal à sodium possiblement responsable de la rétention de sodium. L'expression de ce canal a été retrouvée chez la plupart des patients néphrotiques étudiés. De plus, nous avons obtenu des résultats préliminaires suggérant que l'expression de ce canal serait induite par la présence anormale d'albumine dans l'urine. Notre projet vise à démontrer le rôle de ces nouvelles cibles (nouveau canal à sodium rénal et albumine urinaire) dans la pathogénèse de la rétention de sodium et des oedèmes associés au syndrome néphrotique.

La réalisation du projet nécessitera l'étude de 126 rats issus de plusieurs lignées de rats : des rats Sprague-Dawley, des rats invalidés pour le gène codant pour le nouveau canal sodique identifié dans le modèle clampé en aldostérone et des rats analbuminémiques Nagase.

Application des 3R S'agissant d'étudier un processus physiopathologique impliquant plusieurs tissus et organes, seuls les modèles animaux permettent de répondre aux questions posées, à l'exclusion de tout modèle cellulaire.

Le nombre total d'animaux a pu être réduit à 126 sur la base de nos études précédentes montrant que des groupes de 7 animaux sont suffisants pour atteindre une signification statistique. Par ailleurs, chaque animal est utilisé pour réaliser un maximum d'analyses différentes en fin de protocole. Enfin tout sera mis en oeuvre pour garantir le minimum de stress et de douleur au cours de l'hébergement préalable aux expériences (mise en oeuvre des procédures d'enrichissement développées par notre centre d'exploration fonctionnelles) et au cours des procédures des protocoles thérapeutiques de prise en charge de la douleur et des critères d'interruption d'expérimentation sont définis afin d'assurer le bien-être des animaux au-cours de l'étude.

15294 L'infection par le virus de la dengue (DENV) provoque plus de 500 000 cas par an, pour lesquelles l'hospitalisation est nécessaire. A l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement contre ce virus et aucun vaccin n'est encore autorisé. Il est donc urgent et crucial de développer des traitements thérapeutiques, ce qui requiert une meilleure connaissance de l'infection par DENV et de sa pathogénèse. Ce virus est transmis à l'Homme par piqûre de moustiques. Le virus de la dengue infecte, initialement, les cellules résidentes de la peau, puis se propage dans le reste de l'organisme. Dans les formes sévères, l'infection conduit à des hémorragies et un syndrome de choc, qui est, en

grande partie, attribuable à la première ligne de défense immunitaire de l'hôte, appelée la réponse innée. Les cellules dendritiques plasmacytoides (pDCs) sont des cellules de l'immunité innée qui ont un rôle clé pour contrer les infections. En effet, elles détectent les composants viraux et, en réponse, sécrètent des molécules antivirales, telles que l'interféron.

Notre projet vise à déterminer le rôle des pDCs au cours de l'infection par DENV. Les méthodes d'étude *in vitro* ne permettent pas d'examiner la contribution de la réponse innée dans la régulation l'immunité de l'hôte et donc le contrôle de l'infection. Afin de comprendre l'importance des pDCs dans la réponse immunitaire contre DENV, il est donc nécessaire d'utiliser un modèle animal comprenant les différents acteurs du système immunitaire. Ainsi, seule l'étude de modèle *in vivo* permet de comprendre l'importance des pDCs, intégrée dans la réponse immunitaire, contre DENV.

Le nombre total des souris prévu pour la réalisation de ce projet est de 1252. Ce nombre inclut un groupe de souris génétiquement modifiées permettant de définir la contribution de pDCs (souris déficientes ou non pour la réponse immunitaire réalisée par les pDCs), ainsi que des groupes contrôles nécessaire pour la comparaison, et donc l'interprétation des résultats. Autant que possible, et par mesure de remplacement, nous favoriserons l'étude de la réponse cellulaire des pDCs par des expériences *in vitro* utilisant des cellules isolées, plutôt que des expériences sur l'animal. Le nombre de souris utilisées, a été réduit au maximum tout en permettant des analyses statistiques (test Anova). Les études ont été conçues conformément au principe de raffinement, à savoir le minimum de manipulations des souris sera réalisé et un plan de surveillance et de traitement de souffrance des animaux sera mis en œuvre. Notamment, la manipulation des souris se limitera à l'injection d'anesthésiant, l'infection et l'injection d'anticorps ou de cellules pour certains groupes d'animaux, suivie de l'euthanasie après un intervalle de temps réduit. De plus, selon notre expérience et d'autres études, l'infection par DENV dans ces modèles ne provoque pas de souffrance ou douleur observable.

15295 But du projet : la recherche appliquée et translationnelle

L'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) est une sentinelle du système sanguin, dont il assure la fluidité. Cette propriété est mise à profit en clinique, pour le traitement pharmacologique de la phase aiguë des accidents vasculaires ischémiques (AVC). Ainsi, l'injection intraveineuse de tPA recombinant a révolutionné la prise en charge des patients. Mais le tPA vasculaire pourrait mettre en danger les cellules nerveuses et de l'interface sang/cerveau, dont l'intégrité est déjà compromise par l'AVC. En outre, il a aussi été suggéré que le tPA vasculaire pourrait contribuer à la réserve hémodynamique cérébrale (couplage neurovasculaire), voire de façon plus élargie, à diverses fonctions cérébrales, comme le comportement. Les éléments en faveur d'un rôle clef du tPA sanguin dans la physiopathologie cérébrovasculaire restent critiquables. En effet, ils sont pour la plupart obtenus chez des souris dont le tPA est invalidé dans tout l'organisme, et/ou en augmentant l'expression du tPA à des niveaux non pertinents. A ce jour, aucun outil n'a permis de sélectivement éliminer le tPA circulant sans affecter le tPA des autres compartiments de l'organisme. Notre objectif ici est donc de mettre en place un modèle de souris sans expression endothéliale de tPA (l'endothélium est considéré comme étant la source de tPA vasculaire), basé sur le système « Cre-Lox ». Des souris exprimant la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur de la Ve-Cadhérine seront croisées avec des souris tPA^{Flox+} (générées par le laboratoire). Leur niveau circulant de tPA devrait être nul et dans les autres organes, en particulier le cerveau, le niveau de tPA ne devrait pas être modifié.

Cette étude basée sur l'expérimentation animale prend en compte le bien-être animal et les pratiques éthiques, et répond à la règle des 3R (remplacer, réduire, raffiner)

- Nous avons souscrit au principe de remplacement en sélectionnant le modèle présentant le meilleur compromis entre pertinence et sensibilité. La souris est l'espèce animale dont l'interface entre le système vasculaire et le système nerveux a été la plus étudiée et pour laquelle il existe des souches génétiquement modifiées d'intérêt. Les mécanismes en sont donc globalement établis, ce qui nous permettra d'interpréter nos résultats de manière fiable. L'ensemble des acquis et des

connaissances dont nous disposons rend cette espèce particulièrement intéressante dans le cadre de notre étude.

- Nous utiliserons le nombre minimal d'animaux (calcul de puissance et/ou acquis de nos expériences) afin de souscrire au principe de réduction. Cette étude nécessitera néanmoins 44 souris pour être menée à bien.

- Afin de souscrire au principe de raffinement, les animaux seront anesthésiés durant chaque procédure. Leur bien-être sera suivi 2 fois par jour grâce à du personnel formé 7j/7 y compris les jours fériés. Ils seront hébergés dans des cages aux normes européennes. Une attention particulière sera portée à l'environnement de la cage (enrichissement, accès facilité à la nourriture et à la boisson) et au bien-être de chaque animal. Les principes éthiques et les standards de raffinement seront utilisés jusqu'à la mise à mort de l'animal.

Mots clefs activateur tissulaire du plasminogène, thrombolyse, AVC, hémodynamique

15296 Il est maintenant démontré que des cellules progénitrices, dites « souches », se maintiennent dans le cerveau adulte des vertébrés. Elles sont organisées en zones germinatives locales, capables de générer de nouveaux neurones dans le cerveau mature. Le maintien contrôlé du nombre et de l'activité de ces cellules souches est d'importance fondamentale pour la physiologie cérébrale ainsi, une déplétion des zones germinatives chez l'homme et le rongeur corrèle avec des troubles de l'humeur (dépression, sensibilité aux drogues de dépendance), et avec les troubles de la mémoire associés au vieillissement, alors que la transformation et l'amplification des populations souches pourraient être à l'origine de tumeurs cérébrales. Le but de ce projet est de comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires contrôlant le maintien des populations de cellules souches dans le cerveau car ces mécanismes restent encore mal connus. Nous utilisons comme modèle expérimental un poisson chez qui, au contraire des mammifères, une large population de cellules souches est maintenue dans le cerveau adulte. Par ailleurs, ces cellules sont de localisation superficielle (au contraire des mammifères où elles sont profondes), permettant une imagerie en temps réel non invasive sur animal vivant, anesthésié. L'avantage majeur d'un tel modèle sera donc de pouvoir combiner une analyse du comportement des cellules souches *in vivo* dans leur environnement intact chez un vertébré, et ce sans nécessiter d'approches expérimentales invasives. Ce projet nécessite 2 procédures, de classe au maximum modérée. Le nombre total d'animaux nécessaires à ce projet est au maximum de 114 sur 5 ans. Nous aurons soin de respecter la règle des 3R grâce aux mesures suivantes

Remplacement Le travail sur cellules souches en culture a clairement révélé des comportements cellulaires aberrants jamais observés *in vivo*, notamment concernant le mode et la fréquence de division. Ces deux paramètres impactent de façon directe le maintien, la déplétion ou l'amplification des populations souches du cerveau. Par ailleurs, l'un de nos buts spécifiques est de comprendre les interactions existant entre les cellules souches et leur environnement. Notre projet nécessite donc une approche *in vivo*. L'utilisation du poisson permet cependant des approches largement non-invasives puisque les cellules souches peuvent directement être filmées *in situ* à travers la peau et le crâne de l'animal sans nécessité d'intervention chirurgicale.

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

Raffinement Pour les manipulations, nécessitant une immobilisation, des procédures d'anesthésie seront effectuées. Les animaux sont suivis quotidiennement et des points limites permettant de mettre fin à l'expérimentation par une mise à mort sont définis afin de limiter la souffrance et le mal être des animaux.

15297 Le sepsis est une affection médicale sérieuse caractérisée par des réponses inflammatoires systémiques dérégulées en réponse à une infection, conduisant à un dysfonctionnement d'organes, concomitantes d'une phase d'immunodépression responsable d'une susceptibilité accrue au développement d'infections secondaires. Malgré une prise en charge précoce des patients (antibiotiques à large spectre, réanimation hémodynamique, etc.), le sepsis reste associé à un taux de mortalité important dans les unités de soins intensifs (20-40% des patients septiques 28 jours après le sepsis et 50-70% dans les mois suivants) essentiellement dû à l'incapacité du système immunitaire du patient immunodéprimé à répondre contre de nouvelles infections. Rétablir l'homéostasie du système immunitaire du patient septique représente donc un enjeu capital.

Le modèle animal est actuellement le seul modèle permettant d'étudier le système immunitaire et reproduisant la complexité de la dynamique du sepsis qui englobe à la fois des mécanismes hémodynamiques, biochimiques et immunologiques.

Le modèle CLP combinant la nécrose tissulaire et le sepsis polymicrobien, reproduit le plus fidèlement possible les mécanismes biologiques observés chez l'Homme. De plus, il s'agit du seul modèle dans lequel coexistent les deux phases clés du sepsis la phase inflammatoire et la phase d'immunodépression.

De précédents travaux ont montré que le modèle murin CLP induisait des paramètres caractéristiques de l'immunodépression du système immunitaire adaptatif et inné tels que ceux observés chez le patient septique. Les cellules de la réponse immunitaire innée et adaptative ont des rôles différents, mais complémentaires, dans l'instauration de la réponse immunitaire. En effet, à la suite d'une infection, la réponse innée représente la première ligne de défense de l'organisme et précède donc la réponse adaptative. Restaurer le système immunitaire inné et adaptatif représente donc un intérêt médical majeur chez le patient septique immunodéprimé.

L'objectif de cette étude est de comparer la capacité d'un candidat immunothérapeutique à celle de la protéine recombinante référente à restaurer la réponse immunitaire adaptative de l'animal immunodéprimé à la suite d'un épisode septique.

Cette étude s'inscrit dans un projet de recherche global visant à développer de nouveaux traitements de l'immunodépression induite par le sepsis ciblant à la fois les cellules de la réponse immunitaire innée et adaptative. Ceci permettrait aux patients de restaurer leur système immunitaire et ainsi prévenir les infections secondaires pouvant leur être fatales.

Règle des 3R : Pour atteindre les objectifs de ce projet, il n'existe pas de méthode alternative reproduisant l'immunodépression à la suite d'un sepsis n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptible d'apporter le même niveau d'information. Le nombre d'animaux utilisés a été calculé comme étant nécessaire et suffisant pour pouvoir analyser statistiquement les résultats en tenant compte des études précédentes.

Un suivi d'éléments physiologiques et comportementaux des animaux aura lieu deux fois par jour jusqu'à la fin de chaque expérience afin d'évaluer le bien-être animal et d'intervenir de manière rapide et appropriée en cas de nécessité. Ainsi, des points limites adaptés au modèle CLP ont été définis. De plus, les analgésiques appropriés seront utilisés tout au long de la procédure. Les conditions d'hébergements des animaux seront rigoureusement contrôlées.

Le nombre de souris nécessaires pour ces expériences est évalué à 180 maximum. Cependant, les expériences prévues ne seront réalisées que si les conditions énumérées dans la procédure sont atteintes, afin de diminuer au possible le nombre d'animaux utilisés.

15298 Les produits de santé (médicaments, dispositifs médicaux, etc.) constituent un élément clé dans la dispensation de soins de qualité aux patients. En effet, en alliant innovation et santé, la recherche et le développement s'avèrent indispensables pour favoriser le progrès médical et l'accès aux meilleurs soins à tous.

Or, par nature, ils sont destinés à être mis en contact avec le corps humain et peuvent donc entraîner des effets secondaires au niveau du site d'implantation des dégradations importantes des tissus environnants peuvent nécessiter une ré-intervention chirurgicale. Des séquelles fonctionnelles peuvent en résulter dans les cas les plus graves. L'innocuité des produits de santé doit donc être

testée pour garantir le bon rétablissement des patients après chirurgie. Par ailleurs, tout produit de santé se doit d'être efficace lors de son utilisation clinique.

Il est donc impératif, comme le souligne la réglementation (ex ISO 10993, Pharmacopées Nationales, lignes directrices (OCDE), directive 2007/47/CE), de prouver l'efficacité des produits de santé et de réduire au minimum le risque que des réactions indésirables se manifestent avant de proposer un produit sur le marché. Nous sommes fortement engagés 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 ni de couvrir l'ensemble des risques toxiques incombant aux produits de santé ni d'en tester intégralement l'efficacité, 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 de la sécurité et des performances des produits de santé sur des modèles animaux, les rongeurs, les lagomorphes, les petits ruminants ou les porcins sont des modèles privilégiés pour ce type d'étude étant données les similitudes reconnues avec l'organisme humain. L'utilisation du modèle canin est également envisageable dans des cas exceptionnels, mais elle reste très rare pour raison éthique.

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 2900 rats, 2500 lapins, 80 cobayes, 200 ovins, 200 porcins, 100 caprins, et 100 chiens soit un total de 6080 animaux.

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 hors période post-opératoire. Les rongeurs et porcins sont hébergés en groupes sociaux harmonieux sauf lorsque les contraintes de l'étude l'empêchent. Dans tous les cas, pour toutes les espèces sociales, l'hébergement individuel devra être justifié et validé par la structure du bien-être animal. Concernant les lagomorphes, des contacts visuels, olfactifs, auditifs voire tactiles entre congénères sont maintenus grâce à la structure des compartiments. Des enrichissements standards spécifiques à chaque espèce (produits de nidification pour les rongeurs, jouets pour les porcins/chiens et chainette + baton à ronger pour les lagomorphes) sont présents dans les hébergements. Enfin, de la musique est diffusée en salle d'hébergement.

Un comité d'éthique et une structure du bien-être animal intégrant plusieurs vétérinaires travaillent à temps plein de façon à veiller à l'application du meilleur niveau de soin.

15299 L'infarctus du myocarde se définit comme la nécrose d'une partie plus ou moins grande du muscle cardiaque, lorsque cette zone n'est plus irriguée par les artères coronaires qui lui apportent l'oxygène véhiculé par le sang. L'artère coronaire correspondante peut être obstruée par un caillot ou thrombus (thrombose), rétrécie par des plaques d'athérome (athérosclérose) ou momentanément fermée par un spasme (contraction spontanée d'une artère de durée variable) la circulation du sang est alors coupée. La prise en charge de l'infarctus du myocarde consiste à rétablir le flux sanguin en débouchant l'artère le plus rapidement possible après le début des symptômes. Bien que cette reperfusion soit obligatoire pour la survie du patient, elle engendre par elle-même des répercussions que l'on associe aux problèmes d'ischémie/reperfusion qui peuvent induire des phénomènes de mort tissulaire jusqu'à plusieurs jours après la reperfusion.

La thérapie par photobiomodulation (PBMT) est étudiée depuis les années 1960 pour son potentiel d'action thérapeutique et particulièrement pour sa propriété à accélérer la vitesse de cicatrisation et de régénération des tissus. La PBMT se définit comme une irradiation lumineuse non thermique aux longueurs d'ondes visible et proche infrarouge, notamment, pour stimuler la consommation d'oxygène en phase d'hypoxie ou stimuler la réponse cellulaire et tissulaire afin d'améliorer la cicatrisation des tissus et en réduire l'inflammation. Schématiquement cette stimulation se base principalement par l'absorption des photons au niveau mitochondriale, organelle produisant la majorité de l'énergie cellulaire appelée « ATP » (Adénosine Tri Phosphate). La proposition actuelle et largement acceptée du mécanisme d'action de la PBMT est que l'énergie absorbée par les protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale module notamment la génération de « ROS » (reactive oxygen species) induisant des signalements intra et intercellulaires conduisant à la transcription de gènes, puis à la réparation / régénération cellulaire et tissulaire.

Ainsi nous souhaitons démontrer l'efficacité de la PBMT in situ sur le tissu myocardique ischémique à réduire significativement la perte de la fonction myocardique après reperfusion.

Aujourd'hui, la PBMT bénéficie de nombreuses études et publications scientifiques de hauts rangs prouvant son intérêt dans de nombreux domaines médicaux. Elle est notamment reconnue pour favoriser la récupération musculaire à la suite d'un exercice intensif (diminution du lactate sanguin) ou réduire les troubles liés à la dégénérescence maculaire, mais aussi montre des effets thérapeutiques remarquables par rapport aux pathologies neurodégénératives ou aux dommages d'ischémie/reperfusion (I/R).

Nous développons un dispositif médical (DM) basé sur une technologie innovante capable de maintenir l'homéostasie et d'aider à la préservation et à la régénération des tissus par la thérapie par photobiomodulation (PBMT).

L'objectif de cette étude préclinique est d'évaluer la sécurité, la performance et l'efficacité d'un dispositif médical innovant permettant le traitement de l'ischémie/reperfusion cardiaque par la PBM sur un modèle de porc de taille réduite sur lequel nous induirons une ischémie cardiaque suivie d'une reperfusion de la coronaire. A ce jour, l'ensemble des protocoles précliniques utilisant la PBMT et présentés dans les études ne réalisent que des irradiations photoniques externes à l'organe. Nous voulons développer un produit qui permet d'irradier le cœur in situ pour permettre à la technologie PBMT de pallier significativement les effets de la reperfusion lors de la prise en charge de l'infarctus aigu du myocarde.

Pour montrer son efficacité, cette étude présente une difficulté quant au modèle à proposer, l'objectif étant pour être suffisamment pertinent, d'être proche de la pathologie humaine. Aussi avons-nous comme objectif de produire un modèle proche de la réalité clinique et suffisamment reproductible. Le porc est le modèle qui nous apparaît le plus opportun pour mener cette étude.

Cette lignée présente une taille adulte pertinente et une anatomie vasculaire suffisamment proche de l'homme pour en faire un modèle satisfaisant d'essai préclinique.

De plus, de façon générale, le porc possède une physiologie coronaire et cardiaque très semblable à l'homme. Cette vascularisation est très intéressante pour les travaux sur les maladies coronariennes et fait du porc le modèle le plus pertinent à l'heure actuelle pour ce domaine particulier.

Pour ce projet, un total de 54 porcs seront utilisés.

des test de faisabilité aigus sans réveil (n=6)

une étude à court terme (n=24)

une étude à moyen terme (n=24)

L'objectif de cette étude (évaluation préclinique sur porc de taille réduite) est de fournir un niveau de preuves sur la sécurité, la performance et l'efficacité de notre DM. Sur la base des résultats obtenus et dans les circonstances de non risques potentiels, des essais chez l'Homme pourront être proposés.

Règle des 3R

1-Nous avons réduit au maximum le nombre d'animaux dans chaque groupe pour nous permettre de réaliser une comparaison statistique entre les groupes témoins et les groupes traités

2- Pour réduire le mal être de l'animal à tous les stades de nos interventions

- nous utilisons les techniques les mieux adaptées (chirurgie, réveil, suivi, convalescence...).

- L'entrée des porcs dans la structure expérimentale est programmée de façon à fournir aux animaux un environnement optimum (enrichissement du milieu, mise en loge d'expérimentation au moins 8 jours avant l'intervention...).

- Le protocole d'anesthésie fait appels aux techniques de suivis anesthésiques les plus performants (électrocardiogramme, pressions artérielles, mesures des constantes d'anesthésie,). Pour la chirurgie, nous adjoindrons une anesthésie locale à l'anesthésie générale, qui permettra en outre une analgésie au réveil de la zone traitée.

- lors du réveil, les animaux recevront des antalgiques et seront surveillés quotidiennement avec un enregistrement des effets indésirables.

En présence d'un point critique, la personne en charge du suivi des animaux possède une procédure d'urgence pour intervenir rapidement, ou signaler l'événement pour suite à donner.

- Pour la mise à mort, l'animal est toujours préalablement anesthésié avant induction d'une surcharge anesthésique.

3- Les effets de a PBM ont été testés au préalable sur des embryons de poulet et sur des cardiomyocytes en culture. Le modèle préclinique (utilisation animaux) est obligatoire avant le passage chez l'homme.

15300 Ce projet vise à comprendre quels sont les déterminants qui influent sur le succès transfusionnel des concentrés plaquettaires.

Les composants plaquettaires (CPs) sont des produits thérapeutiques pour lesquels il n'existe pas de substitut. Ils représentent environ 10% des Produits Sanguins Labiles transfusés mais induisent jusqu' 40% des effets indésirables.

Cela est dû en partie aux produits sécrétés par les plaquettes elles-mêmes. Notamment, diverses molécules sécrétées par ces dernières influent sur la réponse biologique et ont des conséquences inflammatoires graves. Les raisons pour lesquelles les plaquettes s'activent et libèrent ces molécules ne sont pas encore entièrement comprises. Elles pourraient être dues à plusieurs paramètres, y compris les incompatibilités entre les donneurs et les receveurs, mais également le processus de préparation et de préservation des plaquettes.

Ce protocole vise à explorer quelles sont les conditions de préparation entravant le rendement transfusionnel des CPs. L'objectif final est d'améliorer les processus de préparation des composants plaquettaires et le diagnostic des produits dégradés afin de réduire les complications transfusionnelles. Le rendement transfusionnel sera évalué dans des modèles de souris immunodéficients pouvant accepter la transfusion de plaquettes humaines. Les protocoles habituels nécessitent la mise à mort de l'animal pour le suivi du rendement transfusionnel, une approche non-invasive permettant le suivi longitudinal sans mise à mort, réduisant ainsi le nombre d'animaux utilisés, a été privilégiée.

Ce projet portera sur un total de 1618 souris sur 5 ans. Le nombre de souris est justifié par l'investigation de 60 modalités de stockages/préparation des concentrés par rapport à une modalité contrôle. 5 unités d'aphérèses différentes sont actuellement en place dans divers sites de transformation en France. Pour chacune de ces unités, les plaquettes sont stockées pour différentes durées (J+0, J+2, J+7, J+12), sachant que la durée habituelle de stockage est de 7 jours. Chacune de ces conditions sera évaluée en concomitance avec différentes températures de conservation (traditionnelle = 22°C, basse = 4°C et modérée = 10 degrés °C). Les préconisations actuelles pour la température de conservation sont de 22°C mais il existe des arguments scientifiques justifiant une conservation froide. L'objectif scientifique de ce projet est de clarifier cette question.

L'effectif a été réduit a minima sans mettre en péril l'interprétation statistique et la valorisation des résultats. La réduction de cet effectif provient notamment des études *in vitro* préalables permettant l'identification des modalités de transformation des CPs d'intérêt.

Un enrichissement de l'environnement sera mis en place pour améliorer la qualité de vie et le bien-être des souris, notamment du matériel de nidification. Tout au long de l'expérience, les animaux seront notés selon une grille de pondération du bien-être. Des antalgiques et anesthésiques sont prévus en cas de constatation de mal-être et un point limite objectif a été établi.

Notons finalement que la souris est le seul modèle permettant un suivi systémique de la transfusion de plaquettaire et qu'il n'est pas possible en l'état de substituer ce dernier. Les différents prélèvements biologiques s'effectueront sous anesthésie.

15301 Notre institut se propose de former de nouveaux chercheurs sur les méthodes modernes qui permettent de manipuler l'expression génétique chez le cerveau des souris. La méthode consiste à faire l'injection intraventriculaire d'un virus adeno-associe (AAV) chez les cerveaux des souriceaux dans les premières 72h qui suivent la naissance. Cette technique permet d'étudier du stade précoce du développement du cerveau jusqu'à son vieillissement et sa dégénérescence chez les adultes.

Le projet de cette formation est ainsi de montrer les nouvelles techniques d'imagerie à haute résolution qui permettent d'observer et d'étudier la dynamique des circuits synaptiques, la glie et la matrice extracellulaire dans les tranches du cerveau.

Dans le respect de la règle des 3R (Réduction, Raffinement, Remplacement)

Pour comprendre l'activité des circuits neuronaux dans le cerveau, il est nécessaire de générer des données biologiques pertinentes. L'utilisation d'animaux est donc inévitable. Les souris sont les modèles animaux de prédilection pour les recherches dans ce domaine en raison de leur structure anatomique et de la fonction bien définies des différents cortex corticaux.

L'expertise de nos instructeurs depuis 15 ans sur ces modèles garantit que le nombre d'animaux utilisés est minimisé par une pratique toujours de haute qualité dès le départ. De même il est extrêmement important pour nos objectifs éducatifs de pouvoir démontrer et mettre en pratique les actes de préparation chirurgicaux, le nombre d'animaux sera donc adapté en conséquence.

Afin de réduire au minimum la souffrance des animaux, les animaux seront hébergés dans un environnement enrichi de maisons en carton ou de carrés de cellulose avec lesquels ils peuvent construire des nids. Lorsque les injections sont finies, les souriceaux (P0-P2) sont remis dans leur cage d'origine avec leur mère et les autres membres de la même portée.

Enfin, les méthodologies utilisées dans ce projet impliquent la mise en œuvre de toutes les stratégies expérimentales et pharmacologiques disponibles actuellement pour réduire le nombre d'animaux utilisés mais aussi minimiser les possibles effets délétères pour ceux-ci, avec un respect particulier de la notion de points limites (critères d'interruption en cas de souffrance des animaux).

Ce projet a aussi pour but de former les étudiants afin qu'ils soient en mesure de réaliser au mieux les procédures qu'ils auront apprises et transmettre ainsi ces techniques dans leur laboratoire d'origine. Une meilleure connaissance des nouvelles techniques de chirurgie et d'imagerie leur permettra de réduire le nombre d'animaux utilisés lorsqu'ils voudront réaliser ces techniques pour leurs besoins de recherche.

La durée de ce projet de formation est de 5 ans et nous utiliserons un nombre total de 100 souris C57BL/6

15302 Les lésions cartilagineuses représentent un problème de santé majeur en raison de la faible capacité de régénération de ce tissu. De nombreuses approches d'ingénierie tissulaire ont été testées pour la réparation du cartilage, en utilisant des substrats artificiels pouvant servir de support pour les cellules, des chondrocytes ou des cellules mésenchymateuses autologues, capables de synthétiser une nouvelle matrice extracellulaire. Le choix d'un biomatériau est essentiel au succès clinique, et un biomatériau idéal devant imiter de près l'environnement naturel du tissu afin de favoriser la colonisation et la différenciation cellulaire ainsi que le maintien du phénotype différencié.

Le but de cette étude est d'évaluer l'effet d'un nouveau biomatériau à base de polysaccharides végétal pour favoriser la réparation de défauts du cartilage dans un modèle de lapin.

Après approbation du comité d'éthique, des lapins blancs de Nouvelle-Zélande (6 lots de 6 lapins avec 2 délais d'implantation soit 72 lapins) seront opérés sous anesthésie générale pour l'implantation de biomatériaux dans les défauts ostéochondraux trochléens fémoraux bilatéraux. Après 1 ou 3 semaines de cicatrisation (étude de deux délais d'implantation), les animaux seront euthanasiés. Des analyses histologiques semi-quantitatives des tissus seront utilisées pour évaluer la réparation du cartilage et des os à des stades précoces.

Les 6 groupes sont les suivants :

- groupe 1 témoin négatif : défaut vide
- groupe 2 témoin positif ou prédictat
- groupe 3 : produit test condition 1
- groupe 4 : produit test condition 2
- groupe 5 : produit test condition 3
- groupe 6 : produit test condition 4

La règle des 3R a été appliquée afin de

-Remplacer l'utilisation des animaux au vu de l'approche thérapeutique abordée dans ce projet, il n'existe pas d'autres méthodes permettant d'éviter ou remplacer l'utilisation des animaux

-Réduire au vu des objectifs visés pour le projet sur la base des données bibliographiques et les tests statistiques prévus, un nombre minimum d'animaux sera inclus sans pour autant entraver l'objectivité scientifique du projet (n=6 par groupe incluant le risque anesthésique de mort de 5%. Il est prévu un calcul statistique sur la base du nombre d'animaux par groupe : la régénération osseuse et cartilagineuse sera mesurée dans les défauts comblés avec les différentes préparations expérimentales (témoins et conditions test). Les résultats seront exprimés par la moyenne +/- l'écart type. Pour une différence de 40% de repousse osseuse entre les groupes, une valeur de $p < 0,05$ et une puissance de 0,9, le calcul statistique indique $n=5$ /groupe. Nous avons choisi $n=6$ /groupe pour compenser une mortalité éventuelle en cours de l'étude.

-Raffiner les manipulations se dérouleront dans le strict respect du bien-être des animaux. A cet effet, l'hébergement est assuré dans des cages individuelles conformément à la réglementation en vigueur.

Le modèle chirurgical est maîtrisé et réalisé par des chirurgiens qualifiés. Des traitements analgésiques adaptés seront mis en place et ajustés au niveau de douleur identifiée individuellement sur chaque lapin. Toute maladie concomitante apparaissant pendant l'inclusion dans l'étude fera l'objet de soins et traitements adaptés. L'échec aux traitements conventionnels et l'impact de la maladie sur les résultats de l'étude seront évalués comme point limite.

Les animaux ont accès librement aux granulés spéciaux pour lapins et à l'eau de boisson (ad libitum). L'enrichissement du milieu se fait par des jouets (blocs en bois et boule métallique) et une tablette surélevée permettant aux lapins de passer au dessus ou de s'abriter en dessous par des ouvertures adaptées évitant la luminosité environnante en cas de besoin.

Les manipulations ont été regroupées (anesthésies et chirurgies). Les animaux seront surveillés quotidiennement. Les points limites ont été définis à priori infection du site

opératoire résistant à l'antisepsie locale et à l'antibiothérapie, fracture du fémur (peu probable dans ce modèle ostéochondral, maladie respiratoire ne rétrocedant pas à un traitement antibiotique (Souffrance durable « dommages irrémédiables »).

15303 Le médulloblastome (MB) est une tumeur embryonnaire maligne localisée au niveau de la fosse cérébrale postérieure. Il s'agit d'une lésion tumorale maligne du cervelet, avec une tendance à disséminer (métastases) via les voies de circulation du liquide cérébro-rachidien (LCR). Il représente 40 % des tumeurs cérébelleuses, 15 % de l'ensemble des tumeurs cérébrales et la première cause de tumeur cérébrale maligne chez l'enfant. On estime à 150 le nombre de nouveaux

cas annuels diagnostiqués en France. Le taux de survie global à cinq ans est de l'ordre de 75% à 80% en l'absence de métastases qui représentent l'un des principaux facteurs risques et de récurrence. Le traitement standard actuel comprend la chirurgie, la chimiothérapie et/ou la radiothérapie. Bien que ces traitements améliorent la survie, les chances de guérison restent encore faibles, en particulier pour les formes à haut risque en raison de récurrences. Les séquelles à long terme du traitement sont encore dramatiques (neuro-intellectuelles et endocriniennes) et ce souvent au détriment de la qualité de vie des patients concernés. Par conséquent, associer une thérapie biologique ciblée aux stratégies habituelles de traitement du médulloblastome constitue un enjeu prometteur. Actuellement, les thérapies ciblées faisant appel à l'immunothérapie (notamment les anticorps monoclonaux) connaissent un véritable essor. Le développement de modèles animaux pertinents qui reproduiront la pathologie humaine est donc indispensable pour comprendre la biologie de la tumeur, développer et évaluer ces nouvelles thérapies ciblées moins toxiques. L'un des défis dans le traitement du médulloblastome est la présence de la barrière hématoencéphalique limitant l'accès au site de la tumeur et protégeant celle-ci de la vigilance du système immunitaire. Cependant, ce concept a été récemment révisé car il a été démontré que les cellules immunitaires, particulièrement les cellules Natural Killer (NK) peuvent infiltrer les tumeurs cérébrales et jouer ainsi un rôle prépondérant dans l'immunité anti-tumorale. Les cellules NK sont un sous ensemble de lymphocytes capables de tuer directement les cellules tumorales sans sensibilisation préalable. Ainsi, il est attribué aux cellules NK une fonction importante dans l'immunité anti-tumorale avec une relation claire entre la surveillance qu'elles assurent, l'activité anti-tumorale qui en découle et la signification pronostique dans différents types de cancers.

Le potentiel anti-tumoral de ce type de cellules immunitaires a été démontré « *in vivo* » à travers une étude préliminaire sur la lignée humaine de médulloblastome DAOY. Les résultats apportés au terme de ce projet sont très prometteurs dans la mesure où les cellules NK semblent ralentir la progression tumorale. Cependant cette étude préliminaire révèle une implication non négligeable des cellules NK d'origine murine dans la réponse anti-tumorale. C'est pourquoi, nous souhaitons nous tourner vers une stratégie visant à minimiser l'impact des cellules NK murines pour valider notre approche stratégique d'administration de cellules NK humaines. La déplétion des cellules NK murines se fera par l'administration d'un anticorps spécifiques des cellules NK de souris 6 jours et 2 jours (procédure 3) avant l'administration des cellules NK humaines (procédure 4) suivi d'une administration d'IL15 (procédure 5). En outre, nous souhaiterions potentialiser l'effet anti-tumoral des cellules NK humaines en le combinant à un anticorps monoclonal visant à cibler les récepteurs EGFR impliqués dans la croissance tumorale pour permettre une réponse liée à la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC). L'objectif de cette étude est donc de déterminer l'intérêt thérapeutique des cellules NK humaines stimulées avec un anticorps anti-EGFR sur 3 lignées tumorales classiques de médulloblastome humain (lignées cellulaires DAOY, D283-Med et D341-Med) xénogreffées en sous-cutanée chez la souris immunodéprimée de la souche nude (procédure 1 et 2). Pour cela, nous souhaitons suivre l'évolution de la croissance tumorale (procédure 6 avec un suivi de 40 jours maximum) ainsi qu'analyser le devenir des cellules NK humaines après leur administration par cytométrie en flux dans le sang périphérique.

Actuellement, il n'existe pas de modèle animal d'immunothérapie par cellules NK dans le cadre du médulloblastome. En outre, nous ne pouvons pas remplacer le modèle « *in vivo* » par des approches alternatives (Remplacement) car le microenvironnement tumoral ainsi que l'immunité jouent un rôle important dans le développement tumoral et dans la réponse aux agents thérapeutiques. Cependant, une preuve de concept réalisée sur culture « *in vitro* » a conforté la pertinence de la poursuite de nos travaux sur le modèle animal. De même, nos travaux précédents sur ce modèle de tumeurs nous ont fourni une expertise permettant d'optimiser (Réduction) le nombre d'animaux nécessaires dans ce projet. Le projet utilisera au total 141 animaux (47 souris par lignée cellulaire). Enfin, le choix des points limites relativement précoces par rapport à l'évolution de la pathologie en tenant compte notamment du volume des tumeurs permettra un arrêt éthiquement acceptable des expérimentations (Raffinement).

15304 Les « Lipoprotéines de Haute Densité » (HDL) sont des complexes lipoprotéiques responsables du transport du cholestérol des tissus périphériques vers le foie. Ces complexes sont connus pour leurs propriétés anti-thrombotiques, anti-inflammatoires, anti-apoptotiques, anti-oxydantes et vasculoprotectrices. Au-delà de leur fluctuation contribuant aux pathologies cardiaques, un faible taux de HDL a également été retrouvé dans d'autres maladies comme facteur de risque d'accidents vasculaires cérébraux, de diabète, d'asthme... Les HDL pourraient alors représenter un vecteur thérapeutique très intéressant dans bon nombre de pathologies chez l'homme.

Le sepsis est défini comme une réaction systémique en réponse à l'agression d'un micro-organisme qui se manifeste par une atteinte de l'endothélium et des tissus avec pour conséquence l'apparition de défaillances d'organes. Lors d'un choc septique, le poumon est l'organe très fréquemment et précocément atteint.

Une étude précédente nous a permise d'observer l'innocuité de l'instillation de HDL par voie nasale, ainsi que le devenir et la pharmacocinétique des HDL administrées par cette voie grâce à une imagerie par scintigraphie au Technecium radioactif (instillation distribution au goutte à goutte d'une solution médicamenteuse).

De plus, nous avons démontré dans une autre étude que l'injection de HDL permettait de diminuer la mortalité, de diminuer l'orage inflammatoire induit par le choc septique et de neutraliser, au moins en partie, les bactéries circulantes. La voie pulmonaire est largement utilisée en clinique pour l'administration de médicaments. L'administration de HDL par voie nasale pourrait représenter une piste thérapeutique intéressante dans les pathologies inflammatoires pulmonaires ou bronchiques (telles que l'asthme, la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO)...) et notamment dans le cas de sepsis.

Nous utiliserons un maximum de 54 souris (C57BL/6) âgées de 10 semaines. Dans un premier temps, avant de démarrer l'étude, nous mettrons en place une nouvelle technique d'imagerie à fluorescence acquise au laboratoire en utilisant la technique d'administration intra-nasale que nous maîtrisons. La technique d'imagerie à fluorescence n'est pas invasive, ni nocive et simple à exécuter. Nous estimons alors que 10 souris seront nécessaires pour la mise en place de l'imageur à fluorescence (dont 3 souris seront utilisées pour l'entraînement au geste opératoire pour le modèle sepsis). Ce seront des souris qui seront issues de l'élevage de notre laboratoire, classées hors protocoles.

L'objectif de cette étude sera ensuite d'observer la biodistribution des HDL au cours d'un sepsis afin de déterminer quels organes intègrent le HDL suite à une administration par voie respiratoire et de quantifier les HDL dans ces différents organes. Pour cela nous utilisons 14 souris mâles en état septique et 8 souris mâles "shams" ainsi que 14 souris femelles en état septique et 8 souris femelles "shams" âgées de 10 semaines (Les souris "shams" sont des souris ne subissant pas toute la procédure chirurgicale jusqu'à induire l'état septique. Elles resteront dans un état non septique. Ce seront les souris contrôles de l'étude).

Les mesures pour déterminer les avantages d'une administration intranasale de HDL suite à un sepsis seront le dosage des molécules inflammatoires dans le plasma, l'évaluation de la charge bactérienne dans le plasma et organes.

Ce projet pourrait permettre d'avoir des données pouvant être utilisées pour discuter d'une future administration d'HDL en intra-nasale chez l'homme dans le cadre d'un sepsis ou éventuellement d'autres maladies.

Remplacement Le sepsis est un syndrome aigu complexe impliquant tous les organes qu'il est impossible de modéliser *in vitro*. De plus, l'étude de la biodistribution doit nécessairement se faire sur un organisme dans son ensemble. Nous avons besoin de toute la complexité de la réaction inflammatoire d'un organisme vivant pour mimer la pathologie humaine et pour pouvoir procéder à nos observations.

Réduction Les expérimentations ont été conçues afin d'utiliser le moins d'animaux possible tout en permettant de réaliser des études statistiques. La technique d'imagerie, nous permet d'utiliser moins d'animaux, car nous pouvons observer simultanément ce qui se passe dans les différents organes et à différents temps post-injection sans devoir sacrifier plusieurs animaux à chaque étape de la

cinétique. Dans un souci de réduction, 3 souris sur les 10 servant à la mise au point de l'imagerie seront réutilisées pour l'entraînement au geste opératoire. Les 10 souris seront issues de l'élevage du laboratoire.

Raffinement Durant les procédures chirurgicales, les animaux seront maintenus anesthésiés et sur un plateau chauffant afin d'avoir un état d'inconscience de qualité et de réduire l'angoisse de l'animal. Un analgésique sera administré afin de prévenir les douleurs per et post-opératoires. Les souris seront hébergées dans des conditions optimales (température, hygrométrie, cycle jour nuit 12h/12h, enrichissement des cages) au sein d'une animalerie agréée. Les animaux sont nourris à volonté et toute manipulation invasive sera précédée d'une anesthésie générale.

Concernant les points limites durant les 24h d'expérimentation, l'animal sera observé son comportement, son activité (s'il est isolé, passif), sa posture (s'il est prostré), son pelage (s'il est hérissé, s'il y a perte de poils), sa respiration (si le rythme est rapide ou saccadé) toutes les deux à six heures en fonction de l'état des souris. Afin de prévenir les douleurs liées au modèle sepsis une dose d'analgésiant sera injectée toutes les 6h post-chirurgie. Durant les acquisitions d'images, les souris seront observées régulièrement. S'il y a modification anormale de la fréquence respiratoire, la distribution d'anesthésie sera ré-ajustée.

15305 L'obésité est reconnue comme une maladie par l'organisation mondiale de la santé (OMS) depuis 1997. Le contrôle de la balance énergétique (équilibre entre les dépenses énergétiques de l'organisme et les apports par la prise alimentaire) est normalement assuré par le cerveau, avec un rôle prépondérant de l'hypothalamus, une structure cérébrale bordant le troisième ventricule. L'hypothalamus dispose de réseaux de neurones sensibles à de multiples signaux véhiculés par le sang, qui renseignent notamment sur l'importance des réserves énergétiques de l'organisme. Entre ces réseaux de neurones et le compartiment sanguin, des cellules gliales jouent un rôle d'interface, contrôlant le passage des signaux du compartiment sanguin vers les neurones, ou relayant l'information par l'émission de substances neuroactives. Deux types de cellules gliales de l'hypothalamus, les astrocytes et les tanocytes, constituent deux interfaces sang/cerveau aux propriétés différentes. Les vaisseaux sanguins irriguant le cerveau sont pour la plupart dotés d'une épaisse paroi qui les rend peu perméables. Les astrocytes, avec leurs nombreuses ramifications étoilées, entourent ces vaisseaux sanguins peu perméables de l'hypothalamus et contactent des neurones voisins. Des vaisseaux sanguins très perméables sont cependant présents dans l'hypothalamus, concentrés dans une région à proximité du troisième ventricule. Les Tanocytes, localisés en bordure du troisième ventricule et au contact direct du liquide céphalo-rachidien (LCR), envoient de longues ramifications qui entourent ces vaisseaux sanguins très perméables et les isolent du reste de l'hypothalamus. Les tanocytes constituent ainsi une interface sang/LCR et peuvent transférer des substances depuis le compartiment sanguin vers le LCR et émettre des substances neuroactives dans le LCR. Ces substances peuvent alors diffuser depuis le LCR vers les neurones de l'hypothalamus.

L'hypothèse d'un dysfonctionnement des cellules gliales sous-tendant la mise en place de l'obésité est actuellement activement testée. Dans ce contexte, notre projet concerne le rôle d'une protéine, la connexine Cx43, grâce à laquelle les cellules gliales communiquent entre elles et émettent des substances neuroactives. La Cx43 permet de constituer des jonctions communicantes entre cellules gliales, avec de très nombreux canaux intercellulaires par lesquels les cellules gliales coordonnent leurs activités. De plus, la Cx43 permet de constituer des héli-canaux s'ouvrant sur le milieu extracellulaire par lesquels les cellules gliales peuvent émettre des substances neuroactives. Notre objectif global est de tester l'impact sur la balance énergétique d'une délétion du gène codant pour la protéine Cx43, spécifiquement dans les astrocytes ou les tanocytes de l'hypothalamus.

Ce projet pilote a pour objectif de mettre au point la procédure de délétion spécifique de la Cx43 dans les astrocytes ou dans les tanocytes de l'hypothalamus et déterminer le délai post-traitement auquel cette procédure est effective. Une souche de souris génétiquement modifiées sera utilisée, permettant de provoquer la délétion spécifique de Cx43 dans les astrocytes ou les tanocytes par une injection intracérébrale d'un agent pharmacologique spécifique. La cartographie histologique des astrocytes et tanocytes ayant répondu au traitement sera réalisée à deux délais post-injection.

Dans le cadre des 3R (Remplacement) L'utilisation d'animaux à des fins scientifiques se justifie ici car il n'existe, à ce jour, aucune méthode de substitution *in vitro* n'utilisant pas l'animal de laboratoire et permettant l'étude de l'implication des cellules gliales dans le contrôle de la consommation alimentaire et du poids corporel. (Réduction) Le nombre de souris nécessaires à ce projet pilote est de 64 souris. Ce nombre a été défini au plus juste compte tenu du nombre de paramètres à tester et des mesures à effectuer pour la mise au point technologique visée ici. (Raffinement) La chirurgie d'injection intracérébrale sera réalisée sous analgésie morphinique, anesthésie générale et contrôle stéréotaxique, avec un traitement antalgique et anti-inflammatoire en postopératoire. Un suivi postopératoire régulier permettra de repérer précocement tout animal en souffrance de sorte à administrer un traitement analgésique supplémentaire, ou sortir un animal de l'étude en cas d'atteinte des points limites établis. En fin de projet, la mise à mort des animaux pour l'analyse histologique sera réalisée sous analgésie morphinique et anesthésie générale. Tout au long du projet, l'hébergement des animaux se fera en cages collectives avec un enrichissement du milieu, dans un environnement à température et hygrométrie contrôlées et un cycle jour/nuit 12h/12h.

15306 Les traitements actuels utilisés en chimiothérapie font appel à des molécules qui, si elles restent dans la circulation sanguine et/ou se distribuent de façon générale avec une absence de spécificité d'organes ou tissus, peuvent générer une toxicité dite périphérique. L'objectif de ce projet est de coupler le traitement à un nano-objet (le nanoprimer) afin d'améliorer le ratio bénéfice-risque de traitements systémiques en oncologie (amélioration d'efficacité, réduction de toxicité) Il s'agit donc de comparer la biodistribution ainsi que l'efficacité anti-tumorale de la composition thérapeutique (molécule thérapeutique + nanoprimer) et de la molécule thérapeutique (traitement de référence utilisé chez les patients).

Le nanoprimer est une nanoparticule lipidique. La première molécule thérapeutique utilisée dans le cadre de ce projet est l'Irinotecan. Ce nouveau projet a pour but de poursuivre la précédente étude (biodistribution et efficacité) menée sur la doxorubicine et l'irinotecan qui nous a permis de valider notre approche grâce aux premières preuves de concept réalisées. Ainsi la précédente étude a montré une augmentation d'efficacité anti tumorale de l'ordre de 50% du traitement irinotecan lorsque combiné au nanoprimer (pour une même dose d'irinotecan). Durant ce projet nous allons reproduire ces résultats avec différentes doses d'Irinotecan et de nanoprimer. Nous étendrons ces expériences à de nouvelles compositions thérapeutiques associant différentes molécules thérapeutiques au nanoprimer.

Ce projet est basé sur le même schéma que le précédent pour chaque composition thérapeutique une étude de biodistribution ainsi qu'une étude d'efficacité, seront réalisées sur des souris porteuses de tumeur. L'étude de biodistribution permettra d'évaluer l'accumulation de la composition thérapeutique versus le traitement de référence dans la tumeur ainsi que dans les organes et tissus sains. L'étude d'efficacité déterminera quant à elle, le retard de croissance tumorale induit par la composition thérapeutique, toujours en comparaison avec le traitement de référence. Durant ce projet nous testerons 7 compositions de chimiothérapie chacune sur 2 modèles tumorale. Chaque composition inclura 192 souris au total qui seront ensuite réparties à raison de 96 animaux pour la biodistribution et 96 animaux pour l'efficacité soit un total de 2688 animaux sur la durée du projet.

La sélection de cette espèce de rongeur est basée sur le fait que le modèle de tumeur humaine greffée chez la souris nude est le modèle de référence pour l'étude des traitements anti-cancéreux. Le nombre d'animaux requis a été défini en fonction du pourcentage de prise de greffe des modèles tumoraux utilisés (dans les modèles tumoraux MDA-MB-231-luc-D3H2LN, HT29, PC3) et la nécessité d'obtenir un nombre suffisant d'animaux présentant une bonne prise tumorale pour réaliser les tests statistiques sur les résultats obtenus pour chaque étude. Ceci permettra de ne pas compromettre l'objectif scientifique du projet en évitant notamment de devoir dupliquer les expériences si le pourcentage de prise de greffe devait être trop faible.

L'objectif d'un nombre de 8 animaux greffés avec succès / groupe a été choisi de manière à prendre en compte l'hétérogénéité de croissance tumorale et permettre la mise en place des tests statistiques permettant d'analyser les données de l'étude. La détermination de points limites précis

(volume tumoral < 1500 mm³, perte de poids < 20%) ainsi que des mesures permettant de soulager la douleur ou l'inconfort (analgésie, réchauffement...) ont été établis afin de réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, la douleur et l'anxiété subie par les animaux au maximum. La complexité des mécanismes biologiques fait que le modèle animal choisi ne peut être remplacé par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants.

15307 L'hémorragie sous-arachnoïdienne (HSA) figure parmi les premières causes d'admission en réanimation. Elle correspond à une issue de sang d'origine artérielle dans les espaces sous-arachnoïdiens. La principale étiologie est la rupture d'un anévrisme artériel intracérébral. L'impact socio-économique de cette pathologie est majeur puisqu'elle touche des sujets jeunes dont un tiers des survivants conservent de lourdes séquelles neurologiques. Le principal facteur associé à l'importance du handicap post HSA est la survenue d'une ischémie cérébrale retardée (ICR). Or, à ce jour, en dépit de plusieurs décennies de recherche, aucune thérapeutique testée chez l'homme n'a fait la preuve de son efficacité pour réduire l'incidence de l'ICR.

Cette situation s'explique par une physiopathologie de l'ICR qui n'est que partiellement connue. L'ICR a longtemps été rattachée à la seule survenue de vasospasme artériel qui peut apparaître chez un tiers des patients entre 4 et 21 jours après le début de la maladie. Le vasospasme, en réduisant le débit sanguin cérébral dans le lit vasculaire d'aval, serait responsable d'une ischémie cérébrale dans le territoire concerné. Cependant, la survenue d'ICR en l'absence de diagnostic de vasospasme artériel (et inversement) ajouté à l'inefficacité des thérapeutiques cherchant à rétablir le calibre de la lumière des artères spasmées a conduit à explorer de nouvelles voies. Afin de mieux comprendre les mécanismes à l'origine de l'ischémie cérébrale retardée et ainsi effectuer une recherche translationnelle efficace, il est nécessaire de disposer d'un modèle expérimental d'hémorragie sous-arachnoïdienne reproduisant les complications aiguës et tardives de l'HSA telles que l'ICR. Actuellement, aucun modèle murin d'HSA ne satisfait à la définition récente de l'ICR, établie par la communauté scientifique.

Par ailleurs, une dysfonction précoce de la perfusion glymphatique a récemment pu être mise en évidence 24 heures après HSA. En parallèle, il a été montré par cette même équipe qu'une injection de tPA en intra-ventriculaire améliorerait de façon précoce la perfusion glymphatique.

L'étude de la perfusion glymphatique tardive après HSA ainsi que son implication dans les déficits comportementaux des animaux n'ont pas été étudiées.

Les deux objectifs de ce projet sont (1) le développement d'un modèle de HSA chez la souris dans lequel la survenue de l'ICR est évaluée par imagerie cérébrale et étude comportementale. (2) L'étude sur ce modèle de la perfusion glymphatique. L'effet d'une injection précoce de tPA en intra-ventriculaire sur la perfusion glymphatique tardive sera également étudiée.

Cette étude basée sur l'expérimentation animale prend en compte le bien-être animal et les pratiques éthiques et répond à la règle des 3R (Remplacer, Réduire et Raffiner). La souris est l'animal le plus étudié dans le domaine des accidents vasculaires cérébraux (AVC) hémorragiques et présente le meilleur compromis entre pertinence scientifique et sensibilité de l'espèce. La physiopathologie est donc globalement établie, ce qui nous permettra d'interpréter nos résultats de manière fiable. L'ensemble des acquis et des connaissances dont nous disposons rend cette espèce particulièrement intéressante dans le cadre de notre étude. Notre projet ne nous permet pas d'utiliser d'autres moyens qu'un modèle animal sous anesthésie.

Nous utiliserons le nombre minimal d'animaux par une planification rigoureuse des expériences afin de souscrire au principe de réduction. Un total de 118 animaux va être nécessaire pour réaliser notre projet. En effet, ce nombre d'animaux correspond au nombre minimum d'animaux nécessaires pour obtenir une puissance statistique suffisante. Nous avons donc calculé que des groupes de 12 animaux par condition seraient nécessaires. L'utilisation d'outils d'imagerie non invasive permettant un suivi longitudinal permet de réduire significativement le nombre d'animaux utilisés.

Afin de souscrire au principe de raffinement, les animaux seront anesthésiés durant chaque procédure dès la présence de souffrance, de douleur ou d'anxiété. La douleur suite à la survenue de l'AVC hémorragique est considérée comme modérée : les observations initiales montrent que

les animaux se déplacent et s'alimentent normalement, prennent bien soin de leur pelage, n'émettent aucun son et ne présentent aucun « sickness behavior syndrom ».

Le bien-être des animaux sera suivi par du personnel formé bi-quotidiennement 5j/7 et quotidiennement pendant les WE et jours fériés. Les animaux seront hébergés dans des cages standards aux normes européennes. Les principes éthiques et les standards de raffinement seront utilisés jusqu'à la mise à mort de l'animal.

Mots clefs hémorragie sous-arachnoïdienne; ischémie cérébrale retardée vasospasme.

15308 Toute chirurgie abdominale expose à un risque de complication bien connu l'adhérence post opératoire. L'incidence des adhérences intrapéritonéales varie de 67% à 93% après des opérations abdominales chirurgicales générales, notamment le traitement chirurgical des hernies inguinales. L'adhésion se fait entre le péritoine (membrane qui protège les organes de l'abdomen et les maintient en place) et la paroi abdominale par la formation de bandes fibrineuses denses. Ce phénomène est dû au saignement causé par l'acte chirurgical entraînant l'activation de la cascade de coagulation ainsi que la formation de thrombine, et à la fin la formation de fibrine, qui va entraîner la formation de bandes fibrineuses, entre ces tissus. Il se produit dans les 5 à 7 jours suivant l'opération et peut réduire la qualité de vie des patients (douleurs, obstruction, infertilité), entraîner des dépenses de santé supplémentaires et complexifier les actes chirurgicaux.

Face à ces situations quotidiennes difficiles, peu de ressources thérapeutiques efficaces existent actuellement. Il est donc nécessaire de développer des implants capables de prévenir les adhésions intra-abdominales. L'utilisation de matériaux biodégradables est donc intéressante dans ce cas pour éviter les réinterventions chirurgicales. Ce projet porte donc sur la limitation des réinterventions, tout en prévenant les phénomènes d'adhésions, en greffant des polymères bioactifs et biodégradable qui présente des propriétés anticoagulantes) à la surface d'un implant déjà utilisé dans le traitement de la hernie inguinale. Les modifications de surface visent à lutter contre la coagulation, donc la fibrinogénèse, qui favorisent la formation de bandes fibrineuses.

L'étude *in vitro* sur notre matériel développé a montré la présence de molécules actives ayant une activité anticoagulante. Mais ces résultats ne peuvent pas se remplacer à des données *in vivo* sur l'efficacité anti adhérente. L'objet de ce protocole présent est donc de tester l'activité de différents support textile fonctionnalisés avec des molécules anticoagulantes ou d'autres molécules actives dans un modèle rat qui mesure objectivement la formation d'adhérences intra-péritonéales.

Brièvement, cette étude consiste à créer des blessures sur la paroi abdominale et le caecum. Les plaies sur la paroi abdominale de rats seront ensuite recouvertes ou non-couvertes de matériaux anti-adhérents. Quatorze jours après la chirurgie, les adhérences seront évaluées par incidence, gravité, zone d'adhérence sur la paroi abdominale. Nombre total d'animaux pour ce projet sera 100 rats (Sprague Dawleys).

Tous les efforts ont été faits pour les remplacer par des alternatives non sensibles, réduire au minimum le nombre d'animaux utilisés et affiner les expériences afin de causer la douleur et la détresse minimales.

Remplace : Bien que les résultats obtenus par les tests *in vitro* (nous aient montré un effet très prometteur) peuvent pas se remplacer à des données *in vivo*, ils nous permettent de sélectionner que le meilleur matériel pour l'étude animaux, donc éviter ou réduire l'utilisation des animaux

Raffiner : 1. Toutes les procédures seront effectuées sur les rats anesthésié ne provoquent aucune douleur. Tout au long de l'opération, les rats seront sous isoflurane, sur plaque chauffante, reçu de l'anesthésie locale (spray de xylocaïne) sur les plaies. Les animaux recevront en postopératoire un traitement analgésique (buprénorphine durant 72 h) et un régime normal ad libitum.

2. Au cours de l'étude, les rats subiront un examen clinique quotidien pour observer l'avancement de la guérison de la plaie, d'éventuels signes de développement de l'infection grave de la plaie, et de rechercher les points limites qui concernent notamment l'altération de l'état général (anorexie, perte de poids rapide ou progressive supérieure à 20%, ou indice corporel de souffrance <2/5, etc.). En cas de problème, des mesures d'urgence sont appliquées, c'est-à-dire, les animaux recevront de la buprénorphine par voie intra-musculaire (10 µg/kg) pour le contrôle de la douleur pendant 48

h. Si la prise en charge n'est pas efficace, une euthanasie sera réalisée par injection de 1 mL de T61® en intra cardiaque avant que les animaux souffrent.

3. De plus, la chirurgie est réalisée par du personnel formé et sensible aux règles d'éthique expérimentale.

Réduire : En référence aux publications antérieures, minimum 10 animaux par groupe sera suffisant pour montrer avec une puissance statistique suffisante ($\alpha=80\%$, $p=0.05$) avec une différence entre les groupes par l'efficacité anti adhérence. Les études précédentes ont été réalisées pour démontrer les procédures expérimentales, avec laquelle les objectifs scientifiques sont atteints.

15309 INTRODUCTION : La paralysie faciale est une atteinte grave et invalidante dont les répercussions psychologiques, sociales et économiques sont importantes. Malgré des progrès dans le délai et la qualité de la prise en charge chirurgicale, les résultats en matière de récupération nerveuse après traitement chirurgical sont limités. Les Cellules Gliales Olfactives (CGOs) et leurs précurseurs (PCGOs) sont une thérapie cellulaire prometteuse car ils semblent promouvoir la repousse axonale après une lésion nerveuse traumatique.

Le but de cette étude est de montrer que l'interposition d'un tuteur veineux contenant des PCGOs entre les extrémités distale et proximale du nerf facial sectionné, améliore sa récupération fonctionnelle.

METHODE : Le modèle animal est le rat adulte syngénique Fischer, et 64 rats seront nécessaires à notre étude les 64 rats de 8 semaines seront répartis dans 4 groupes. Le paradigme de réparation étudié sera la suture avec interposition de tuteur veineux, en présence ou non de cellules gliales olfactives ou de PCGOs préparés dans du Matrigel, comparé à la suture nerveuse directe (Gold Standard).

L'évaluation à 3 mois portera sur la récupération fonctionnelle (mouvement des vibrisses, fermeture palpébrale, symétrie faciale, syncinésies oeil-bouche), l'activité électrophysiologique (syncinésies, réflexe de clignement, récupération du signal électrique), et l'histologie (comptage des fibres myélinisées, taille des fibres et de la gaine de myéline, densité axonale par immunofluorescence, densité des cellules transplantées marquées à la GFP par immunofluorescence, coloration rétrograde).

Les rats seront opérés sous anesthésie générale induction par inhalation d'isoflurane à 5% puis entretien de l'anesthésie au masque par inhalation d'isoflurane à 2,5%. De plus, l'antalgie post-opératoire sera assurée par des injections intramusculaires de Nalbuphine 5mg/kg à visée préventive et curative (avant le réveil, puis 2 fois par jour pendant 15 jours, puis en cas de signes de souffrance, après une induction courte à l'isoflurane 5%), et par administration de Doliprane dans l'eau de boisson à visée préventive. Le nombre d'animaux a été évalué à partir des études proches de celle-ci précédemment effectuées dans notre laboratoire et dont les statistiques avaient été établies pour réduire au minimum le nombre d'animaux opérés. Les conditions d'hébergement, de soins, d'antalgie et les méthodes utilisées seront adaptées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux qui seront observés pluriquotidiennement durant toute la durée du protocole expérimental. Le suivi du poids des animaux, de la prise alimentaire, de l'aspect physique externe ainsi que l'apparition de sécrétions, d'excrétions anormales seront surveillés et permettront de contrôler l'absence de souffrance, en complément de l'examen du comportement de l'animal. Tout signe de souffrance entraînera l'euthanasie des animaux.

RESULTATS ATTENDUS : Le bénéfice attendu serait une amélioration de la récupération fonctionnelle, électrophysiologique et histologique après paralysie faciale traumatique grâce à la greffe de PCGOs.

Ce résultat pourrait être étendu aux autres nerfs périphériques, et donc améliorer la prise en charge de nos patients victimes de lésions des nerfs périphériques.

15310 Le projet présenté ici vise à mettre au point et caractériser un modèle animal innovant de schizophrénie. Cette maladie psychiatrique grave touche 1% de la population et les traitements

actuels ne sont hélas pas satisfaisants. Ils n'améliorent en effet qu'une partie des symptômes et induisent des effets secondaires qui parfois aggravent les autres symptômes. Cette absence de traitements pourrait être due au fait que les modèles animaux de cette pathologie qui sont utilisés pour la recherche ne sont pas suffisamment adaptés.

En effet, ces modèles sont en général construits en prenant en compte un seul facteur de risque alors que l'on sait que la schizophrénie est une maladie multifactorielle (facteurs génétiques et facteurs environnementaux).

Sur la base de données épidémiologiques, notre projet est donc de construire un modèle animal qui alliera une prédisposition génétique (délétion partielle d'un gène) avec une perturbation environnementale post-natale précoce (séparation des souriceaux de leur mère pendant 24h à l'âge de 9 jours) et une perturbation tardive à adolescence (administration quotidienne de THC, l'un des composants du cannabis). Les expériences consisteront à étudier les déficits comportementaux chez l'animal devenu adulte (tests d'activité, de mémoire, de sociabilité etc.) puis de tester les effets des médicaments actuels sur ces comportements. Les mécanismes cérébraux impliqués dans ces comportements seront ensuite étudiés post-mortem (études électrophysiologique et immunohistochimique).

Le projet se découpe en trois procédures

- La première permettra de déterminer de possibles différences de sensibilité à notre modèle entre les souris mâles et femelles (besoin de 80 souris).
- La seconde sera nécessaire pour valider d'un point de vue pharmacologique notre modèle en testant l'efficacité d'antipsychotiques utilisés actuellement en clinique (besoin de 160 souris).
- La troisième est la description de la méthode de perfusion-fixation intracardiaque.

Le but ultime de ce projet est de valider le modèle par sa construction (construct validity), les déficits apparus (face validity) et sa prédictibilité (predictive validity).

Le nombre total d'animaux est de 240. Les animaux seront maintenus dans des conditions d'hébergement stables, contrôlées et avec un enrichissement du milieu de manière à assurer un bien-être optimal. Durant toute la durée des expérimentations les animaux sont surveillés quotidiennement par un personnel qualifié et formé, et sont pesés de manière hebdomadaire. La détection d'un animal en état de souffrance ou de mal-être induira immédiatement son exclusion du protocole et sa mise à mort. Les animaux seront fréquemment manipulés avant le début des expérimentations. Ils seront majoritairement exposés à des tests comportementaux au cours de l'étude et les analyses en électrophysiologie et immunohistochimie seront réalisées uniquement post-mortem. Toutes les précautions seront prises pour que la souffrance et l'angoisse occasionnée par les procédures soient minimales. La mise à mort sera occasionnée après une pré-analgésie (méthadone) et une anesthésie profonde (isoflurane).

15311 Les glioblastomes (GB), sont les tumeurs cérébrales primitives rencontrées le plus fréquemment chez l'adulte. Le traitement standard comprend la résection chirurgicale, suivie d'un traitement de radiochimiothérapie avec le témozolomide (TMZ). En dépit de cet arsenal thérapeutique, la survie globale des patients n'excède pas 15 mois et nécessite de proposer de nouvelles thérapies. La croissance de ces tumeurs étant associées à une forte vascularisation, des thérapies anti-angiogéniques ciblant le Vascular Endothelial Growth Factor (via des anticorps anti-VEGF, Bevacizumab) ont été ainsi proposées pour le traitement des GB récidivants. Cependant, le bénéfice de cette stratégie combinée n'a pas démontré de réelle valeur ajoutée puisqu'en réponse à ce traitement, la survie globale des patients ne semble pas être améliorée. Des données récentes de la littérature suggèrent que l'angiopoïétine-2 (Ang2) serait impliquée dans la résistance des GB récidivants après une thérapie au bevacizumab. Par ailleurs, sur des biopsies de patients, ayant reçu auparavant les traitements standards, un recrutement de macrophages est observé au sein de la tumeur. Parmi ces macrophages, certains expriment le récepteur à l'Ang2, dénommé récepteur Tie2. Ces macrophages exprimant Tie2 (TEM) sont décrits comme étant pro-angiogéniques et pro-invasifs. L'ensemble de ces observations cliniques et pré-cliniques, suggère qu'il pourrait être pertinent, d'associer aux traitements conventionnels une stratégie de blocage de la signalisation du

VEGF couplée à une stratégie de blocage de la signalisation de l'Ang2. Ce double ciblage pourrait optimiser l'effet des traitements conventionnels, en limitant le développement des composantes vasculaire et inflammatoire de la tumeur. Ainsi, se pose la question de savoir s'il est possible d'accroître les avantages cliniques actuellement procurés par les molécules anti-VEGF en limitant les processus d'échappement à ce traitement.

A ce jour, il n'existe pas de preuve de concept étayant cette hypothèse. C'est pourquoi, nous proposons de réaliser une étude pré-clinique visant à évaluer l'intérêt du double ciblage du VEGF et de l'Ang2 dans le contexte des glioblastomes afin de se rapprocher des observations cliniques.

Cette étude basée sur l'expérimentation animale prend en compte le bien-être animal et les pratiques éthiques, et répond à la règle des 3 R (remplacer, réduire, raffiner).

La stratégie ciblée dans ce projet doit être testée *in vivo*, le remplacement du modèle animal n'est donc pas possible. En effet, la tumeur se développant au sein d'un environnement complexe, les méthodes de substitution trouvent leur limite et la validation formelle sur animaux est nécessaire.

Afin de réduire au mieux le nombre d'animaux pour cette étude, notre expertise des modèles tumoraux de GB et les travaux antérieurs de l'équipe ont pu montrer que 10 animaux par groupe sont nécessaires afin d'escompter obtenir des résultats significatifs, et ainsi comparer les effets des différents traitements testés.

Ce nombre d'animaux a été proposé afin de pouvoir affirmer nos conclusions après une analyse statistique robuste. Nous envisageons donc de réaliser l'ensemble de l'étude, sur des souris C57bl/6 (140) et C57bl/6 CX3CR1 GFP +/- (100), nécessaires au développement du modèle de GB dans un contexte d'inflammation mais aussi à partir de souris Swiss (174 souris), nécessaires à la préparation de cultures primaires de macrophages et des cultures organotypiques de cerveaux. Soit un nombre total d'animaux de 654 animaux prenant en compte les souris gestantes ainsi que les nouveaux-nés.

Par souci de réduire encore le nombre d'animaux à utiliser, l'efficacité du traitement sera évaluée par comparaison au traitement standard de radiochimiothérapie au moyen de l'imagerie IRM. L'utilisation de l'IRM nous permettra également de suivre l'évolution des volumes tumoraux et ainsi d'arrêter le protocole avant que les tumeurs soient trop volumineuses.

Concernant le raffinement des conditions d'expérimentation, le suivi par IRM contribuera également au raffinement, en nous permettant de sortir les animaux du projet si nécessaire. Par ailleurs, le bien-être des animaux sera suivi bi-quotidiennement par du personnel formé 5j/7 et quotidiennement pendant les WE et jours fériés. L'apparence physique, mais aussi le poids des animaux, suivi 3 fois par semaine, permettra d'évaluer l'inconfort des animaux. Les procédures utilisées seront pratiquées par du personnel formé et expérimenté. Les animaux seront hébergés dans des cages standards aux normes européennes en groupes sociaux (5 animaux par cage) et bénéficieront d'un enrichissement avec la présence d'igloo et de papier "kraft". Les principes éthiques et les standards de raffinement seront utilisés de la naissance à la mort de l'animal.

- 15312** Notre objectif est d'étudier le rôle des néo neurones dans le vieillissement des fonctions cognitives. Jusqu'alors nous avons utilisé le water maze (WM ou labyrinthe aquatique) chez le rat et la souris. Notre objectif est d'utiliser une nouvelle version de ce test le starmaze. Il s'agit d'un WM qui contient des couloirs et permet d'étudier les stratégies des animaux. Nous allons donc dans un premier temps conduire une étude pilote avec ce test. Pour cela, nous utiliserons un total de 30 souris (15 souris âgées et 15 souris jeunes). La règle des 3R a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée sur le terrain. Pour la réduction, le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum pour nous permettre de générer des données statistiques solides. Pour le raffinement, les procédures prennent en compte des temps de récupération et des nombres d'essais visant à réduire le stress et la fatigue des animaux. Enfin, pour le remplacement, les études *in vitro* et sur animaux invertébrés ne permettent pas l'étude de comportements complexes, dans notre cas l'étude de la mémoire spatiale et la navigation, le rongeur est donc une des espèces les plus appropriées pour ce type d'étude.

15313 Le cerveau ne possédant pas de réserves énergétique, il doit pouvoir réguler de manière quasi instantanée les apports énergétiques dont il a besoin pour fonctionner grâce à un mécanisme d'adaptation locale et temporelle du débit sanguin cérébral (DSC). Au niveau cellulaire cette régulation fine se fait au sein de l'unité neurovasculaire et fait intervenir plusieurs types cellulaires du parenchyme cérébral et des artères et capillaires sanguin qui ont pour ultime objectif de subvenir à la demande énergétique des neurones. Ce phénomène est appelé couplage-neurovasculaire.

Ce couplage peut être modulé de manière physiologique par différents mécanismes provenant soit du parenchyme cérébral soit du compartiment sanguin. Parmi les molécules qui influent sur ce mécanisme l'activateur tissulaire du plasminogène semble être un facteur clé. Des travaux antérieurs tendent à prouver que le tPA module de façon positive ce couplage. Des animaux dépourvus de cette protéase présentent une réduction de la réponse vasculaire suite à une activation neuronale. D'autres études montrent que le tPA influence le fonctionnement de certains types de récepteurs présent à la surface des neurones, les récepteurs NMDA. Récemment il a été démontré que ces récepteurs étaient présents à la surface des cellules de l'endothélium vasculaire. Ainsi, ce projet vise à étudier le rôle du tPA sur le couplage neurovasculaire via une activation des récepteurs NMDA endothéliaux.

Pour ce travail des études de couplages seront effectués chez des souris sauvages ou invalidées pour le gène du tPA mâles de 8 à 10 semaines. Des stimulations des vibrisses seront réalisées sous anesthésie générale et le DSC sera enregistré à l'aide d'un système Doppler Speckle en condition contrôle ainsi que lors d'infusion de tPA ou d'agents pharmacologiques permettant d'identifier les voies cellulaires impliquées dans ce processus. Le signal obtenu permettra une analyse fine du DSC au niveau du cortex cérébral et ainsi du couplage neurovasculaire.

Cette étude basée sur l'expérimentation animale prend en compte le bien-être animal et les pratiques éthiques, et répond à la règle des 3 R (remplacer, réduire, raffiner). La souris est une des espèces animales les plus étudiées dans pour le couplage neurovasculaire. L'ensemble des connaissances et des acquis dont nous disposons dans la littérature rend cette espèce particulièrement intéressante pour ce travail. Il est impossible d'étudier le couplage neurovasculaire *in vivo*, dans ce contexte, un modèle *in vivo* n'est pas remplaçable. Une étude de puissance statistique en amont, permet de nous assurer que nous utilisons le nombre minimal d'animaux pour atteindre le résultat souhaité soit 250 souris. Le bien-être des animaux sera suivi bi-quotidiennement par du personnel formé 5j/7 et quotidiennement pendant les WE et jours fériés. Les animaux sont hébergés dans des cages standards aux normes européennes suite à la chirurgie. Les principes éthiques et les standards de raffinement sont utilisés jusqu'à la mise à mort de l'animal.

Mots clefs tPA, couplage neurovasculaire

15314 La leucémie aiguë lymphoblastique T (LAL-T) est un cancer du sang lié à une surproduction de lymphocytes T. Ces derniers s'accumulent dans la moelle osseuse (MO). Les LAL-T touchent des enfants de tout âge, des adolescents et des adultes.

Le pronostic favorable ou non d'un traitement d'une LAL-T est déterminé non seulement par les anomalies génétiques que portent les cellules tumorales, mais aussi par les interactions que ces cellules ont avec leur environnement. Plusieurs études publiées ces dernières années montrent en effet que cet environnement « tumoral » modulerait les capacités de développement leucémique. Plus particulièrement, des travaux indiquent que des signaux émis dans l'environnement immédiat de ces tumeurs et normalement impliqués dans l'inflammation agissent sur la prolifération des cellules LAL-T.

Nous souhaitons mieux comprendre le rôle de l'inflammation dans le développement leucémique et notamment savoir si le fait d'induire une inflammation accélère la prolifération leucémique et si, réciproquement, interférer avec l'inflammation la retarde, voire la diminue. Des modèles de culture cellulaire *in vitro* existent et permettent d'apporter des réponses. Nous les utilisons le plus souvent possible. Pour autant, ces réponses sont partielles car les modèles *in vitro* ne reproduisent ni l'hétérogénéité cellulaire et multi-organe de l'environnement des cellules tumorales d'une LAL-T, ni

les mécanismes de migration, de nichage et de développement leucémique. Un recours à l'utilisation de modèles animaux est indispensable. Dans le cadre de notre projet, nous utiliserons plusieurs modèles de rongeurs normaux ou reconnus comme des modèles de LAL-T humaine ou encore portant des mutations affectant l'inflammation et auxquels nous grefferons des cellules LAL-T.

Nous suivrons et comparerons entre les différents groupes de rongeur l'évolution des populations des différentes cellules hématopoïétiques dans le sang, la moelle osseuse et la rate.

Le nombre d'animaux (1440 sur 4 ans) a été calculé en tenant compte des mises au point et des résultats des études précédentes. Nous utilisons des rongeurs nés dans des élevages de notre animalerie. Les méthodes expérimentales sont effectuées sous anesthésie générale pour éviter stress et douleurs aux animaux. Les injections de cellules leucémiques aux souris se font par voie intraveineuse. Les prélèvements sanguins sont effectués sous anesthésie générale. Une observation quotidienne attentive des animaux est réalisée pendant toute la période des expériences. A la moindre manifestation de douleur ou de signes cliniques, l'équipe d'expérimentateurs interviendra

Les animaux sont hébergés en groupe sociaux pour reproduire leur mode de vie. Un enrichissement en module divers (rouleaux cartonnés et boules de coton) est distribué dans leurs cages afin d'élargir leurs activités quotidiennes.

15315 L'anxiété est un trouble psychique qui touche une grande partie de la population mondiale. Différents traitements médicamenteux sont actuellement disponibles pour lutter contre l'anxiété. Cependant, comme toutes stratégies médicamenteuses, ces dernières présentent des effets secondaires. Le but de ce projet est de tester sur des rongeurs les effets anxiolytiques de 2 nouvelles molécules d'origines naturelles (à base d'algues).

Ainsi, au cours de cette étude, nous évaluerons *in vivo*, chez le rat, les 2 nouvelles molécules, en administration aiguë tout d'abord et en administration chronique ensuite, dans 2 tests comportementaux (open-field (chronique) et test d'enfouissement défensif conditionné (aiguë et chronique)). Les rongeurs sont les espèces animales les plus étudiées dans le domaine de la recherche biomédicale. Sur la base des connaissances et des acquis du laboratoire, ainsi que des analyses statistiques préliminaires, le nombre de rats par groupe a été fixé à 15 maximum, ce qui permet de donner une puissance statistique suffisante aux résultats obtenus. Les animaux seront répartis dans 13 groupes pour les tests comportementaux. Au total, 390 rats seront requis pour la réalisation de cette étude, puisqu'aucun modèle alternatif ne permet d'obtenir les informations nécessaires à ce projet.

A la suite de la partie comportementale, une étude biochimique sera réalisée sur un échantillon de plasma récolté après passage des animaux aux tests comportementaux. Cette étude permettra le dosage sanguin des hormones du stress, telles que l'hormone adrénocorticotrope (ACTH) et de la corticostérone.

Tout au long de ce projet, les animaux seront hébergés dans des cages standards aux normes européennes. Les principes éthiques et les standards de raffinement sont utilisés de la naissance à la mort de l'animal. Le bien-être des animaux sera suivi par du personnel formé, bi-quotidiennement pendant la semaine ouvrée 5j/7 et quotidiennement durant les week-ends et jours fériés. Ainsi, notre demande de projet prend en compte le bien-être animal, les pratiques éthiques et répond à la règle des 3R.

Au total, le projet utilisera 390 animaux.

15316 L'obésité est reconnue comme une maladie par l'organisation mondiale de la santé (OMS) depuis 1997. Le contrôle de la balance énergétique (équilibre entre les dépenses énergétiques de l'organisme et les apports par la prise alimentaire) est normalement assuré par le cerveau, avec un rôle prépondérant de l'hypothalamus, une structure cérébrale bordant le troisième ventricule. L'hypothalamus dispose de réseaux de neurones sensibles à de multiples signaux véhiculés par le sang, qui renseignent notamment sur l'importance des réserves énergétiques de l'organisme. Entre

ces réseaux de neurones et le compartiment sanguin, des cellules gliales jouent un rôle d'interface, contrôlant le passage des signaux du compartiment sanguin vers les neurones, ou relayant l'information par l'émission de substances neuroactives. Deux types de cellules gliales de l'hypothalamus, les astrocytes et les tanocytes, constituent deux interfaces sang/cerveau aux propriétés différentes. Les vaisseaux sanguins irriguant le cerveau sont pour la plupart dotés d'une épaisse paroi qui les rend peu perméables. Les astrocytes, avec leurs nombreuses ramifications étoilées, entourent ces vaisseaux sanguins peu perméables de l'hypothalamus et contactent des neurones voisins. Des vaisseaux sanguins très perméables sont cependant présents dans l'hypothalamus, concentrés dans une région à proximité du troisième ventricule. Les tanocytes, localisés en bordure du troisième ventricule et au contact direct du liquide céphalo-rachidien (LCR), envoient de longues ramifications qui entourent ces vaisseaux sanguins très perméables et les isolent du reste de l'hypothalamus. Les tanocytes constituent ainsi une interface sang/LCR et peuvent transférer des substances depuis le compartiment sanguin vers le LCR et émettre des substances neuroactives dans le LCR. Ces substances peuvent alors diffuser depuis le LCR vers les neurones de l'hypothalamus.

L'hypothèse d'un dysfonctionnement des cellules gliales sous-tendant la mise en place de l'obésité est actuellement activement testée. Dans ce contexte, notre projet concerne le rôle d'une protéine, la connexine Cx43, grâce à laquelle les cellules gliales communiquent entre elles et émettent des substances neuroactives. La Cx43 permet de constituer des jonctions communicantes entre cellules gliales, avec de très nombreux canaux intercellulaires par lesquels les cellules gliales coordonnent leurs activités. De plus, la Cx43 permet de constituer des héli-canaux s'ouvrant sur le milieu extracellulaire par lesquels les cellules gliales peuvent émettre des substances neuroactives. Notre hypothèse est que la protéine Cx43 joue un rôle dans la balance énergétique en coordonnant l'activité des cellules gliales et leur communication avec les neurones au niveau des deux interfaces sang/cerveau présentées ci-dessus.

Notre objectif est ici de tester l'impact sur la balance énergétique d'une délétion du gène codant pour la protéine Cx43, spécifiquement dans les astrocytes ou les tanocytes de l'hypothalamus. Une souche de souris génétiquement modifiées sera utilisée, permettant de provoquer la délétion spécifique de Cx43 dans les astrocytes ou les tanocytes par une injection intracérébrale d'un agent pharmacologique spécifique. Ce projet s'appuie sur les résultats d'un projet pilote ayant permis la mise au point de la procédure de délétion spécifique de la Cx43 dans les astrocytes ou dans les tanocytes de l'hypothalamus. Les modifications génétiques initialement introduites dans cette souche de souris sont connues pour ne pas générer d'effet délétère. Notre suivi continu de l'ensemble des animaux nous permettra de nous assurer du caractère non dommageable des délétions spécifiques de Cx43 dans les astrocytes ou tanocytes de l'hypothalamus et de limiter l'inconfort des procédures expérimentales. La balance énergétique des animaux sera évaluée en testant leur sensibilité aux effets d'un régime enrichi en graisse et leur sensibilité à la principale hormone impliquée dans la diminution de l'appétit.

Dans le cadre des 3R (Remplacement) L'utilisation d'animaux à des fins scientifiques se justifie ici car il n'existe, à ce jour, aucune méthode de substitution *in vitro* n'utilisant pas l'animal de laboratoire et permettant l'étude de l'implication des cellules gliales dans le contrôle de la consommation alimentaire et du poids corporel. (Réduction) Le nombre de souris nécessaires à ce projet est de 400 souris mâles de génotype approprié. Notre expertise nous permet de définir ce nombre au plus juste compte tenu du nombre de paramètres à tester et des mesures à effectuer pour chaque lot d'animaux. (Raffinement) La chirurgie d'injection intracérébrale sera réalisée sous analgésie morphinique, anesthésie générale et contrôle stéréotaxique, avec un traitement antalgique et anti-inflammatoire en postopératoire. Un suivi post-opératoire régulier permettra de repérer précocement tout animal en souffrance de sorte à administrer un traitement analgésique supplémentaire, ou sortir un animal de l'étude en cas d'atteinte des points limites établis. En fin de projet, la mise à mort des animaux pour l'analyse histologique sera réalisée sous analgésie et anesthésie générale. Tout au long du projet, l'hébergement des animaux se fera avec un enrichissement du milieu, dans un environnement à température et hygrométrie contrôlées et un cycle jour/nuit 12h/12h.

15317 Dans la population, les cancers des os sont rares (0,2% de l'ensemble des tumeurs malignes) comparé aux cancers des tissus mous. L'ostéosarcome est le type de tumeur osseuse le plus répandu (45%), suivi par le chondrosarcome (17 à 24%).

Les ostéosarcomes touchent préférentiellement les adolescents et les jeunes adultes. L'ostéosarcome localisé est traité par poly-chimiothérapie pré- et post-opératoire et chirurgie. Les ostéosarcomes métastatiques sont fréquents et sont associés à de plus mauvais pronostiques. Malgré les avancées dans la prise en charge thérapeutique, les taux de survie à 5 ans demeurent inchangés depuis 40 ans 70% pour les formes localisées et seulement 20% pour les patients à haut risque.

Le chondrosarcome de l'os est une tumeur maligne de faible croissance, peu vascularisée produisant du cartilage au lieu de l'os. Celui-ci atteint surtout l'adulte et présente une incidence égale quel que soit le sexe. Selon le site d'occurrence et le grade histologique, il est létal chez 10 à 50% des patients. Ces tumeurs sont résistantes à tous les traitements actuels, basés sur la chimiothérapie et la radiothérapie conventionnelles. Ce type de cancer est donc incurable à l'heure actuelle lorsque cette tumeur n'est pas opérable (base de la tête) ou qu'elle a métastasé. De nouvelles pistes thérapeutiques doivent donc être explorées pour proposer un espoir aux patients atteints de ces tumeurs osseuses.

L'utilisation de micro-ARNs (miARNs ou miRNAs) comme agents thérapeutiques des cancers pourrait être opportune pour ces types de tumeur. Nous avons mis en évidence trois miRNAs tueurs à la fois de cellules de chondrosarcomes et d'ostéosarcomes, mais pas de cellules saines de cartilage *in vitro*. La preuve de leur efficacité doit donc maintenant être réalisée *in vivo* chez l'animal, pour pouvoir transférer cette approche de traitement à la prise en charge clinique des patients. Cependant, le problème majeur de leur utilisation est leur transport jusqu'aux cellules tumorales. Cette étape n'a pas été résolue par le développement de vecteurs viraux et non viraux. Nous proposons de véhiculer ces miRNAs à l'aide de bactéries colonisatrices des ostéosarcomes et des chondrosarcomes.

L'utilisation de bactéries dans la régression de certaines formes de cancer est connue depuis plus d'un siècle. Elles sont capables de s'infiltrer et de coloniser les tumeurs avec une très grande spécificité et peuvent être éliminées par antibiothérapie. De plus, elles peuvent être utilisées comme vecteurs d'agents anti-cancéreux. La capacité des bactéries à synthétiser et véhiculer un miRNA a été démontrée très récemment. Cependant, aucune étude n'a mis en évidence une colonisation bactérienne spécifique des tumeurs osseuses. Par ailleurs, plutôt que d'utiliser des souches bactériennes pathogènes atténuées en virulence, nous privilégions l'utilisation de souches non pathogènes que nous modifierons par Biologie Synthétique pour véhiculer les miARNs.

En ce qui concerne le chondrosarcome, nous voulons véhiculer le meilleur miRNA sélectionné à l'aide de 2 bactéries colonisatrices du chondrosarcome que nous avons identifiées au préalable dans une étude pilote chez la souris immunodéprimée grâce à un modèle de xénogreffe de chondrosarcome humain. Ces expériences doivent être validées sur un dernier lot de 7 souris pour chaque bactérie colonisatrice (soit 14 souris) et complétée par des données d'imagerie. Nous devons maintenant faire la preuve de la colonisation bactérienne des chondrosarcomes chez un animal immunocompétent pour plus de pertinence, mais nous ne pouvons pas nous abstenir d'utiliser un modèle de xénogreffe car les miRNAs ont été validés dans un modèle humain de chondrosarcome. Il n'existe pas de modèle de chondrosarcome établi chez la souris immunocompétente. Nous ferons donc la preuve de la colonisation bactérienne dans un modèle de chondrosarcome de rat généré chez le rat immunocompétent, seul modèle de greffe syngénique de chondrosarcome murin existant (2 bactéries x 4 lots de 7 rats + 12 rats donneurs de greffe, soit 68 rats).

En ce qui concerne l'ostéosarcome, la colonisation bactérienne sera évaluée en premier lieu dans un modèle de xénogreffe d'ostéosarcome humain généré chez la souris immunodéprimée. Nous vérifierons si les 2 souches bactériennes colonisatrices de chondrosarcomes colonisent également l'ostéosarcome, et si besoin nous testerons 5 autres souches (7 souris par souche) comme nous l'avons fait pour le modèle de xénogreffe de chondrosarcome humain (maximum 7 bactéries x 4 lots de 7 souris, soit 196 souris). Dans un second temps, la colonisation bactérienne sera évaluée

dans un modèle de greffe syngénique d'ostéosarcome murin généré chez la souris immunocompétente pour la/les meilleures colonisatrices identifiées (2 bactéries x 4 lots de 7 souris, soit 56 souris).

Dans ce projet, la règle des 3R (Réduire-Raffiner-Remplacer) est suivie. A ce stade du projet et des connaissances des tumeurs osseuses, un passage au modèle animal est nécessaire; les limites du remplacement des animaux par d'autres techniques étant atteintes. Il nous faut en effet identifier des bactéries capables de coloniser les tumeurs osseuses *in vivo* pour les modifier génétiquement afin qu'elles véhiculent les miRNAs sélectionnés *in vitro*. Du fait de la spécificité de chaque souche bactérienne, les bactéries ne pourront être modifiées qu'après avoir identifiées celles qui colonisent ces tumeurs *in vivo*. Nous devons donc déterminer les bactéries colonisatrices de chaque modèle tumoral chez l'animal. Concernant le principe de réduction du nombre d'animaux à utiliser, une estimation du nombre minimum d'animaux a été faite. Une puissance statistique suffisante est estimée avec un minimum de 20 animaux pour le groupe traité. Cela correspond à un nombre total maximum de 68 rats et 266 souris, qui permettront d'atteindre une puissance de l'ordre de 80%. Le raffinement des procédures et l'enrichissement du milieu pour tenir compte du bien-être des animaux sont pris en considération dans ce projet, comme détaillé dans le descriptif des procédures à suivre (acclimatation, surveillance quotidienne, description des anesthésies et des analgésies, personnel compétent formé notamment en chirurgie, prévision des points limites, ajout de matériaux dans les cages.).

15318 Les animaux génétiquement modifiés permettent la modélisation de plusieurs maladies humaines comme les cancers, les maladies auto-immunes et sont donc indispensables en recherche fondamentale pour mieux comprendre les causes de ces maladies. Ils sont porteurs d'une ou de plusieurs modifications génétiques et leur élevage nécessite souvent la détermination très précoce de leur génotype. Pour cela il est nécessaire de

- Prélever de l'ADN sur les souriceaux et rechercher la présence ou non des modifications génétiques transmises par leurs parents.

- Marquer les souriceaux afin de pouvoir corréliser leur génotype au numéro d'identification

Une méthode est particulièrement intéressante car elle permet en un seul geste d'obtenir un prélèvement d'ADN et de marquer définitivement les très jeunes souriceaux. Pour des souriceaux de moins de 10 jours, le prélèvement d'une ou deux phalanges distales maximum est la plus adaptée et est conforme aux recommandations internationales.

Concernant le raffinement, le prélèvement est fait à l'aide de micro-ciseaux chirurgicaux stérilisés. Cette biopsie est réalisée par un personnel compétent et est un geste peu douloureux car, à cet âge, les terminaisons nerveuses et les cartilages ne sont pas encore développés au niveau des doigts. La numérotation des animaux par cette méthode permet un marquage à vie de l'animal sans effet sur sa locomotion ni la sensibilité. Le prélèvement d'ADN avant J10 permet d'avoir les résultats de la présence ou non des modifications génétiques, avant le sevrage des animaux (environ 21j) et permet ainsi de regrouper des animaux issus de plusieurs portées en cage de même génotype et ainsi éviter des bagarres et blessures entre les mâles.

En ce qui concerne le remplacement, nos contraintes expérimentales nécessitent l'obtention du génotypage des souris génétiquement modifiées avant leur sevrage, associé à un marquage à vie de l'animal. Les méthodes alternatives pour le prélèvement d'ADN sont impossibles à réaliser sur des souriceaux de moins de 10 jours et/ou ne permettent pas de marquer les animaux

Pour finir, dans un souci de réduction, le prélèvement d'une ou deux phalanges distales pour assurer le marquage/génotypage des souris sera strictement limité aux souriceaux de moins de 10 jours qui nécessitent un génotypage.

Le nombre d'animaux à identifier/génotyper est basé sur la fréquence des naissances des souris génétiquement modifiées qui est estimé à 4800 par an. Le nombre de petits par portée étant estimé à 6, le nombre de souriceaux identifiés est de 28800 par an soit 144 000 souriceaux maximum pour 5 ans. Ce nombre correspond à la capacité maximale de la zone d'élevage.

15319 1 – Contexte scientifique, médical et sociétal

Les maladies neuropsychiatriques ont souvent des conséquences dévastatrices pour les patients, altérant leur santé ainsi que leur capacité à apprendre et à travailler. Notre capacité actuelle à traiter les troubles du système nerveux central est tragiquement limitée. Ces troubles font souvent intervenir un dysfonctionnement de la structure responsable de la transmission de l'information nerveuse entre deux neurones la synapse. Au cours des dernières années, des mutations génétiques altérant la formation et le fonctionnement des synapses ont été impliqués dans la pathogénie de maladies aussi diverses que le retard mental, la maladie d'Alzheimer ou la schizophrénie, ce qui a conduit au concept de "synaptopathies". Ce projet aborde des questions neurobiologiques fondamentales (mécanismes de formation et de plasticité des synapses, différenciation neuronale, formation des circuits neuronaux) qui sont pertinentes pour comprendre comment le cerveau est construit et fonctionne, et qui pourraient également être altérées dans des conditions pathologiques, notamment dans les synaptopathies.

2- Objectifs : Ce projet de recherche fondamentale s'inscrit dans le cadre de l'étude d'un gène (gène 1). Le gène 1 produit un facteur sécrété par les neurones, qui se concentre aux synapses et qui joue un rôle dans la formation et la plasticité synaptique chez la souris. Le gène 1 est également exprimé dans le cerveau humain et pourrait constituer un gène de susceptibilité de la schizophrénie. Le gène 1 est décrit pour interagir avec d'autres gènes (gènes 2, 3 et 4). Ce projet a pour objectif de rechercher si ces autres gènes (gènes 2, 3 et 4) coordonnent la formation des synapses avec le gène 1, et comment ils pourraient affecter les synaptopathies. Ce projet a été validé par un financement européen ERC.

3- Balance dommage – bénéfique : Notre finalité est d'expliquer la fonction des gènes 2, 3 et 4 dans le cerveau humain sain et pathologique, ce qui n'est pas possible de tester directement. Ce projet a démarré par la caractérisation d'un modèle invertébré et des expériences de culture cellulaire *in vitro*. Cependant les altérations de la formation et de la fonction des synapses ne peuvent pas être testées pleinement par des approches *in vitro*. Le recours à l'expérimentation animale est donc nécessaire pour étudier les altérations des gènes 2, 3 et 4 dans le contexte d'un cerveau entier. L'inactivation de ces gènes devra être conditionnelle et être spécifique de certaines populations neuronales. Ainsi la souris est le modèle de choix pour ce projet (1) son cerveau présente une organisation anatomique complexe, très bien décrite et proche de l'humain (2) son génome est à 98% identique à celui de l'homme (3) c'est le seul modèle dans lequel le système d'inactivation de gène conditionnelle Cre/Lox est établi.

Ce projet, constitué d'une procédure unique, sera réalisé sur 4 lignées de souris portant une mutation permettant l'inactivation conditionnelle du gène 2, 3 ou 4, ou la surexpression du gène 3. Le but est de réaliser des injections cérébrales intra-ventriculaires de vecteurs viraux chez les nouveaux-nés pour induire des mutations des gènes 2, 3 et 4 dans des populations sélectionnées de cellules cérébrales. Les injections intraventriculaires sont des procédures standard. Il s'agit de procédures brèves et les souris se rétablissent complètement, sans dommage ni souffrance durables. Cette procédure réalisée à P0 présente l'avantage d'éviter de réaliser une chirurgie puisqu'à P0 le crâne n'est pas encore complètement formé, il est encore mou. On peut donc réaliser une injection au travers de ce dernier sans chirurgie. Après un temps de survie approprié pour permettre une expression adéquate des protéines codées par le virus, les souris sont mises à mort par perfusion et le tissu cérébral d'intérêt est prélevé et utilisé pour analyser la morphologie des neurones, les connexions synaptiques et certains marqueurs biochimiques.

Le nombre total de souris sera de 128 pour 5 ans.

4- Règle 3R

Une attention particulière sera accordée à la règle des 3R afin de réduire le nombre d'animaux nécessaires tout en s'assurant de la reproductibilité des résultats. Le recours à l'expérimentation animale est nécessaire pour valider l'impact des mutations des gènes 2, 3 et 4 sur la formation et la fonction des synapses dans le cerveau entier. Ces méthodes sont complémentaires d'expérimentations sur des cellules en culture qui sont largement utilisées en parallèle pour cette étude. Afin de réduire le nombre d'animaux, nous réaliserons sur chaque animaux plusieurs

marquages histologiques différents. Comme l'injection est une procédure invasive, les souris sont contrôlées régulièrement dans leur cage d'origine et toute manipulation susceptible d'entraîner du stress sera réalisée par un expérimentateur formé aux techniques de chirurgie, de contention et de manipulation des animaux. Les injections intraventriculaires sont des procédures standard, très brèves et qui n'induisent ni dommage ni souffrance durables. Enfin, la perfusion terminale lors de la collecte des tissus est réalisée sous une anesthésie profonde. Il est important de noter qu'en cas d'atteinte d'un point limite, les animaux seront mis à mort dans le respect de la réglementation et avec l'accord du responsable du bien-être animal de ce projet.

15320 L'exposition aux rayonnements ionisants à la suite d'un accident d'irradiation (accident dans une centrale nucléaire) ou d'un acte de malveillance peut engendrer des conséquences graves sur la santé des personnes impactées. En effet, l'irradiation d'une large surface du corps, à des doses d'irradiation moyennes à fortes, induit des lésions irréversibles regroupées sous le nom de syndrome aigu d'irradiation (SAI). Le syndrome hématopoïétique est le premier syndrome radio-induit mis en jeu chez l'homme dans le cas d'une exposition externe partielle ou « corps entier ». Il se traduit par une chute des éléments du sang plus ou moins sévère résultant essentiellement en des risques hémorragiques et infectieux. Il peut engager rapidement le pronostic vital du patient. Les expositions accidentelles aux rayonnements ionisants étant souvent hétérogènes (une partie de la moelle osseuse restant non irradiée), l'existence d'un possible redémarrage de la production sanguine est en faveur d'un traitement par facteur de croissance. Par contre, si le traitement par facteur de croissance reste inefficace, une greffe de cellules doit être envisagée. Par ailleurs, la situation de l'accident peut impliquer un nombre important de victimes pose le problème de l'accès à des stocks importants de cellules souches est un challenge. La preuve de concept a été établie de la possibilité de générer un tissu hématopoïétique fonctionnel (l'ensemble des cellules du sang) à long terme à partir d'un tout nouveau type cellulaire appelé « hiPSC » (human induced Pluripotent Stem Cells) chez le petit animal. Cette nouvelle technologie permet de produire les cellules à l'origine de la production du sang. Le traitement en urgence de populations nécessite de disposer de produits congelables, permettant de traiter un groupe d'individus. Des banques de cellules souches obtenues à partir d'hiPSC de grade clinique permettront de produire des cellules souches de différents types pour traiter les victimes. Des hiPSC issues de donneurs « universels » sont déjà disponibles et transposable à une échelle industrielle.

L'objectif de ce projet est de progresser vers les essais cliniques par la reconstitution hématopoïétique lors d'un syndrome hématopoïétique chez le cochon. Il s'agira d'évaluer la reprise d'hématopoïèse humaine xénogénique chez le cochon par une greffe de cellules souches hématopoïétique (CSH) humaine. Dans un premier temps, l'efficacité d'un greffon humain chez le cochon sur la reprise hématopoïétique sera validée par une injection de cellules souches de sang placentaire humain en n'induisant aucune toxicité aiguë et chronique. Dans un deuxième temps, l'efficacité des cellules hiPSC congelées et différenciées en cellules souches hématopoïétique (CSH) sera validée sur la reprise hématopoïétique.

Le modèle de choix de l'évolution de la pré-clinique à la clinique est le cochon de petite taille appelé mini porc.

Ce projet multi sites nécessite 24 cochons et sera effectué en collaboration avec un autre établissement pour les différentes étapes selon les expertises et les équipements de chacun (irradiation, hébergement, connaissance du modèle).

Le passage à la clinique nécessite des animaux de grande taille. Il a été montré que la physiopathologie du syndrome hématopoïétique sur le porc de taille réduite (de type miniporc) est similaire à celle observée chez l'homme. De plus étant donné que la production de cellules hiPS en quantité importante est un paramètre limitant, le choix s'est porté sur le miniporc qui est un porc de taille réduite permettant l'injection de cellules en concentration compatible avec leur production. Le nombre d'animaux choisi pour ce protocole est nécessaire et suffisant pour exploiter d'un point de vue statistique les résultats obtenus.

Dans le contexte du bien-être animal, les cages d'hébergement seront enrichies en objets favorisant le bien-être de l'animal. De plus, le raffinement est renforcé par le fait que ces animaux seront

anesthésiés pour toutes interventions (irradiation, prélèvements sanguins) et euthanasiés selon la réglementation en vigueur. Des points limites seront définis et appliqués pour mettre fin dans les délais les plus brefs à toute anomalie ou à toute douleur, toute souffrance, toute angoisse ou tout dommage durable constatés qui pourraient être évités tout au long des procédures expérimentales constituant ce projet. L'euthanasie des animaux sera réalisée selon les méthodes approuvées en limitant le plus possible la douleur, la souffrance et l'angoisse des cochons, par une personne compétente de l'établissement hébergeur. Le transport des animaux sera effectué par le véhicule climatisé dédié à ce transport.

15321 La radiothérapie est un traitement anticancéreux dont bénéficient plus d'un patient sur deux. L'efficacité de la radiothérapie s'explique par la mort des cellules tumorales qui dépend de la dose. Mais l'efficacité anti tumorale est plus complexe et dépend aussi du système immunitaire de l'hôte. Les progrès en immunologie ont permis de faire régresser complètement et de façon durable des maladies métastatiques autrefois incurables. La radiothérapie stéréotaxique hypofractionnée permet l'administration de doses permettant de supprimer les tumeurs et est utilisée pour la prise en charge des tumeurs localisées de petite taille et pour les lésions métastatiques. Elle permet d'appliquer des doses par fraction élevées avec des taux de réponse antitumorale importants. De plus les combinaisons associant de la radiothérapie et de l'immunothérapie montrent une amélioration de l'efficacité de la radiothérapie et de l'immunothérapie sans majorer les effets indésirables. Lorsqu'on délivre une dose adéquate, une inflammation est générée favorisant ensuite l'activation de cellules immunitaires. Une grande partie de l'efficacité de la radiothérapie s'explique par l'action de lymphocytes tueurs, cellules clefs de l'immunité adaptative.

Le système immunitaire joue donc un rôle fondamental dans la progression tumorale ainsi que dans la réponse à la radiothérapie. Ce projet a pour objectif de suivre *in vivo* la réponse à l'association radiothérapie et immunothérapie. Ces tumeurs seront générées chez des souris immunocompétentes et les irradiations stéréotaxiques seront réalisées grâce à un système d'irradiation du petit animal permettant des irradiations fractionnées millimétriques en arc-thérapie. La progression tumorale sera quantifiée par imagerie multimodale fonctionnelle et microtomodensitométrie. Ce projet ouvrira des concepts et des pistes thérapeutiques fondamentales pour l'utilisation optimale des associations radiothérapie et immunothérapie et la réponse anti-tumorale dans ce contexte.

Ce projet multi sites nécessite 260 souris C57BL/6J et sera effectué en collaboration entre différents laboratoires pour les différentes étapes selon les expertises et les équipements de chacun (imagerie, irradiation, connaissance du modèle). Le suivi longitudinal individuel de chaque souris permet de réduire de manière importante le nombre d'animaux nécessaire à cette étude.

La souris est l'animal le plus utilisé dans ce domaine de la recherche avec des résultats qui ont permis à de nombreux traitements d'être testés chez l'homme avec moins de risque et plus de chance de réussite. L'utilisation de l'animal reste indispensable pour ce type de recherche car il s'agit d'évaluer l'efficacité combinée d'un traitement systémique à un traitement par radiothérapie dans un modèle de tumeur. Des cultures cellulaires seules ne pourraient pas répondre aux questions posées.

Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est réduit à son minimum sans compromettre les objectifs du projet. Des calculs statistiques réalisés en amont ont été validés par le comité scientifique en charge du suivi de ce 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 dommages durables que pourraient ressentir les animaux (anesthésie adaptée pour les injections tumorales, les irradiations et l'imagerie, points limites spécifiques). La limitation de la capacité des souris de satisfaire leurs besoins physiologiques et éthologiques sera limitée au strict minimum en enrichissant leur environnement par du coton ou des nids en carton et en leur permettant de vivre en groupe de 2 à 5 souris. Des mesures seront prises pour mettre fin dans les délais les plus brefs à toute anomalie ou à toute douleur, toute souffrance, toute angoisse ou tout dommage durable constatés qui pourraient être évités en définissant des points limites précis et adaptés. L'euthanasie des animaux sera réalisée selon les méthodes approuvées en

limitant le plus possible la douleur, la souffrance et l'angoisse des souris, par une personne compétente de l'établissement utilisateur. Le transport des animaux sera effectué par transporteur agréé ou par le véhicule dédié de l'établissement.

15322 Dans le cadre de la recherche de nouveaux traitements anticancéreux, notre partenaire a mis au point deux composés. Ceux-ci ne sont pas spécifiques d'un type de cancer et pourraient s'avérer très utiles pour compléter l'arsenal thérapeutique à disposition des médecins.

Néanmoins, leur développement est encore à un stade précoce. Ils ont montré une preuve d'efficacité dans des modèles *in vitro* et doivent désormais être testés sur un modèle animal avant de pouvoir atteindre la phase d'essai clinique.

Nous avons déjà validé l'absence d'effets indésirables durant un traitement à long terme sur des animaux sains. Nous souhaitons maintenant établir l'effet thérapeutiques sur des animaux porteurs de tumeurs.

Pour cela, nous prévoyons donc un protocole similaire à celui employé durant cette validation, à savoir 3 injections par semaine.

Les deux composés seront testés aux doses efficaces précédemment et comparés à un traitement de référence utilisant un mode d'action assez proche.

Nous prévoyons donc 72 souris dans ce projet, qui seront répartis en quatre groupes expérimentaux de 18 animaux groupe contrôle, groupe traité avec le composé 1, groupe traité avec le composé 2, groupe traité avec le composé de référence utilisé en clinique humaine.

Ces 18 animaux recevront une greffe de cellules tumorales sous-cutanée et nous suivrons l'évolution de l'apparition des tumeurs ainsi que du poids, trois fois par semaine. Les animaux recevront les traitements la semaine suivant la greffe tumorale.

Au bout de deux semaines suivant la greffe, 8 animaux par groupe seront sortis de l'étude pour des analyses hématologiques et histologiques. Les autres animaux seront étudiés pour déterminer l'évolution des tumeurs.

REDUCTION l'effectif de 10 souris constitue une taille de groupe optimale pour une recherche d'effets thérapeutiques à moyen terme et 8 animaux correspondent à l'effectif optimal pour effectuer les analyses sanguines pertinentes. Ces deux tailles de groupes ont été définies et validées durant les nombreux protocoles effectués dans notre institut avec le même modèle. Nous ne pouvons pas réduire cet effectif sans diminuer fortement la puissance de l'étude.

REMPLACEMENT Dans le cadre de la recherche de potentiels traitements anti-cancéreux, le recours à un modèle animal est encore obligatoire. Nous ne disposons pas de méthode alternative pour déterminer les effets potentiels thérapeutiques de composés.

RAFFINEMENT les composés qui sont testés ici ont déjà montré leur innocuité sur des cultures cellulaires et des animaux et nous n'attendons pas d'effets indésirables majeurs. Néanmoins, les souris seront surveillées tous les jours. Elles disposeront de conditions d'hébergement optimales, avec accès à l'eau, à la boisson et à un enrichissement du milieu. Elles seront maintenues en groupe afin de conserver les interactions sociales, importantes pour cette espèce. Les sites d'injection seront surveillés afin d'éviter toute infection, qui, si cela se produisait, serait traitée avec les conseils de notre vétérinaire. Le modèle tumoral utilisé est décrit dans la littérature et les points limites et la durée de l'étude ont été définis en fonction de ces données. Par ailleurs, nous avons mis en place les points limites nécessaires, liés au volume des tumeurs portées par les animaux et à leur masse relative, à l'évolution probable de l'état de santé. Les animaux seront observés quotidiennement pour s'assurer que leur état de santé n'est pas détérioré, et pesés 3 fois par semaine. Les tumeurs seront aussi palpées (pour détecter leur présence précoce) puis mesurées trois fois par semaines.

15323 Certains cours d'eau de tête de bassin subissent aujourd'hui de manière récurrente des étiages très sévères affectant la dynamique des espèces piscicoles.

L'objectif pour la Fédération pour la Pêche et la Protection des Milieux Aquatiques, est d'étudier sur plusieurs années le comportement de différentes populations de truites communes autochtones lors

d'épisodes de sécheresse (déplacement des individus, facteurs déclencheurs, réponse des différentes cohortes, survie, croissance, identification de zones refuges), mais aussi en dehors de cette période afin d'observer différents aspects de la dynamique de l'espèce (recolonisation, migration pré et post-sécheresse, pré et postreproduction, post-capture, taux de croissance, taux de survie...). Afin de suivre ces déplacements, des individus de truites farios seront capturés au moyen de pêche électrique, sur 2 stations d'études, puis marqués sous anesthésie générale, via l'emploi de marques semi-actives de petite taille (12 à 23mm) adaptées à la taille des individus. Après marquage, les individus seront relâchés sur le lieu de capture afin d'en suivre les déplacements par recherche mobile et fixe (au moyen d'antennes).

Ces observations se feront en lien avec le suivi de facteurs abiotiques pouvant influencer cette dynamique (température de l'eau, variations de débit). Il est en effet établi que la truite commune réalise des migrations plus ou moins longues afin de réaliser son cycle de vie, notamment pour la reproduction. Toutefois peu de données existent sur les déplacements effectués par les individus en période de stress hydrique.

Cette étude rentre dans le cadre d'un objectif d'amélioration des connaissances de l'espèce en vue d'adapter sa gestion dans une optique de préservation des truites autochtones.

Nous avons veillé au respect de la règle dite des " 3R "

- "R" de "Remplacement" : La question écologique posée est d'étudier le comportement individuel de déplacement des individus de truite commune sauvage d'une même population lors de période d'étiage sévère. Ces déplacements pouvant être longs, il n'est pas envisageable de réaliser cette étude en conditions contrôlées. De même, l'absence de données concernant le comportement durant ces périodes critiques pour la survie des individus ne permet pas la réalisation d'une modélisation.

- "R" de "Réduire" : La taille de l'échantillon doit être suffisante pour dégager des résultats fiables. Aussi, 350 individus de truites de toutes tailles seront marqués dont 300 seront marqués sur un cours d'eau à densité de truites importante et 50 sur un cours d'eau à densité de truites faible. Le nombre d'individus est relativement important afin de pouvoir étudier précisément la réponse de chaque classe d'âge aux variations des conditions abiotiques.

- "R" de "Raffiner" : Toutes les manipulations se feront sous anesthésie par du personnel qualifié. Les points géographiques d'intervention seront multiples, le long de la zone d'étude, afin de réduire au maximum le temps de stabulation, de marquage et de récupération des individus. L'ensemble des poissons ne sera remis à l'eau qu'après contrôle de l'état sanitaire et récupération totale de l'anesthésie.

15324 Ce projet d'expérimentation concerne l'activité de routine du contrôle antidopage où l'administration d'une substance thérapeutique à un cheval d'expérimentation est indispensable

-pour s'assurer si besoin que le laboratoire détecte correctement l'administration d'un médicament donné par la détection du produit lui-même ou des produits de transformation (métabolites)

-pour vérifier le temps de détection (ceci est indispensable dans le contexte de l'utilisation de technologies très performantes pour le contrôle antidopage).

Ce projet d'expérimentation est indispensable afin de s'assurer que le contrôle antidopage des chevaux est toujours performant et d'engager les moyens nécessaires pour optimiser les méthodes si besoin en est.

Ce projet d'expérimentation doit aussi permettre d'étudier la pharmacocinétique d'un médicament chez le cheval. Ceci est entrepris uniquement si les données bibliographiques sont insuffisantes. Ces études menées sur un seul cheval (étude pilote) puis ensuite sur 6 ou 8 chevaux conformément au protocole de l'EHSLC (European Horserace Scientific Liaison Committee), ont pour but ultime de définir des limites de screening pour le contrôle antidopage.

Ce projet d'expérimentation concerne aussi l'activité de développement où il est indispensable de vérifier que les méthodes développées répondent parfaitement au but recherché.

Protocole : En dehors des études pharmacocinétique/pharmacodynamique (PK/PD) et certains projets de recherche, les autres études sont généralement réalisées sur un seul cheval ou deux chevaux. Chaque procédure expérimentale comprend trois phases une phase de prélèvement avant administration, l'administration ou le traitement puis des prélèvements après administration. Le médicament est toujours administré par un vétérinaire et le cheval est toujours surveillé pendant le traitement. Les prélèvements sont principalement des prélèvements sanguins et urinaires. Le sang est prélevé par ponction veineuse. Les urines sont collectées après émission spontanée. Des crottins et des crins peuvent aussi être prélevés.

Le nombre total d'animaux utilisés sur cinq ans est estimé à 10, selon le nombre de médicaments à tester sur les cinq ans qui n'excède pas 6/an et par animal. A noter que la détection de la molécule thérapeutique et/ou de ses métabolites est rarement envisagée dans un contexte de combinaisons thérapeutiques, car on s'intéresse à une substance donnée. Dans le cas contraire, des combinaisons connues pour leurs bénéfices thérapeutiques chez le cheval peuvent être utilisées.

Dans ce projet, la règle des 3R a été suivie comme suit

-Remplacer cette étude ne peut être réalisée que chez l'animal vivant et sur l'espèce cible, le cheval. Des analyses *in vitro* ne sont pas toujours possibles. Dans le cas où les tests *in vitro* sont possibles, ils sont réalisés mais les résultats obtenus doivent toujours être complétés et/ou vérifiés par une étude *in vivo* dans l'espèce cible.

-Réduire le nombre d'animaux impliqués est réduit le plus possible. Ces essais sont généralement conduits sur un, deux ou trois chevaux.

-Raffiner Les chevaux sont quotidiennement surveillés et observés. Tout éventuel signe d'inconfort est noté et corrigé et est pris en compte afin d'optimiser les tests ultérieurs. Le bien-être de chaque cheval est une priorité quotidienne du personnel.

15325 Le stress est un facteur de risque de plusieurs maladies mentales affectant des millions de gens et imposant un coût socioéconomique important. Comprendre pourquoi certaines personnes sont plus de susceptibles que d'autres aux maladies mentales liées au stress est un défi prioritaire de la communauté Européenne et des associations de malades.

Notre hypothèse est que le stress créerait un déséquilibre de perception entre des signaux d'alerte et de sûreté échangés entre partenaires sociaux. L'impact du stress serait d'autant plus important qu'il se rapprocherait de la période sensible du neurodéveloppement précoce. La persistance de ce déséquilibre chez l'enfant pourrait entraîner le développement de troubles anxio-dépressifs chez l'adulte.

Le projet vise donc à suivre l'influence des hormones de stress sur le développement des cellules impliqués dans la perception des signaux d'alerte et de sûreté échangés avec des partenaires sociaux.

De nombreuses études cliniques sont actuellement menées chez l'Homme dans lesquelles les hormones ocytocine et vasopressine sont utilisées dans l'espoir de corriger les troubles d'anxiété et de comportements sociaux. Cependant, le mode d'action de ces deux hormones dans le cerveau reste méconnu.

Les expériences seront conduites sur des souris sauvages et des souris génétiquement modifiées pour manipuler les cellules impliquées dans la perception des signaux d'alerte et de sûreté échangés avec des partenaires sociaux.

La réalisation du projet concerne en tout 408 souris génétiquement modifiées homozygotes males repartis en 34 groupes d'animaux soumis a 5 procédures selon 7 expériences visant à tester la contribution des cellules produisant des hormones à la naissance sur le développement de troubles anxio-dépressifs chez l'adulte.

Des mesures visant à Réduire, Remplacer et Raffiner les expérimentations seront mises en place nous combinerons les procédures sur les mêmes souris pour effectuer des analyses multiparamétriques et longitudinales, évitant ainsi d'utiliser plus d'animaux que nécessaire pour la réalisation des objectifs tout en gardant la puissance statistique de rigueur. De plus, nous avons

mis en place des points limites pour évaluer la douleur pour chacune des procédures et garantir le bien-être des animaux et une collecte de données scientifiques pertinentes. Nous utiliserons un schéma thérapeutique visant à réduire les paliers de douleur modérée prévisibles selon les procédures.

Les animaux seront ensuite stabulés en cage transparente et suivis quotidiennement pour des signes de détresse/infection/souffrance. Un analgésique sera administré dans l'eau de biberons pour éviter la douleur possible liée à la cicatrisation chirurgicale. Les animaux montrant d'éventuels signes d'infection seront traités avec des antibiotiques et des analgésiques non-steroidien.

15326 De nombreuses plantes médicinales sont connues et utilisées pour leurs propriétés antioxydantes, hypocholestérolémiantes et hypolipémiantes. Elles contiennent des principes actifs, tels que des polyphénols, phytostérols, stanols et vitamines qui pourraient contribuer à leur bioactivité, notamment leurs propriétés cardioprotectrices, anti-inflammatoires, antidiabétiques, hypolipémiantes, modulatrices du métabolisme énergétique et des voies de signalisation cellulaire. Cette bioactivité est néanmoins dépendante de la biodisponibilité qui regroupe à la fois les données relatives à l'Absorption, la Distribution, le Métabolisme et l'Excrétion (ADME). A ce titre, il est essentiel d'étudier non seulement le potentiel curatif de ces plantes médicinales dans un contexte de perturbations métaboliques mais aussi le devenir de ces principes actifs (métabolites primaires ou secondaires) et leur répartition dans des organes clés tels que le foie, le cerveau, le cœur, les vaisseaux, le tissu adipeux et dans l'urine.

Les plantes médicinales sont connues pour être une source de principes actifs intéressants. Notre laboratoire dispose d'un volet de recherche en thérapies innovantes reposant sur la valorisation de plantes médicinales. Bien que les connaissances sur les plantes médicinales tendent à se développer, il existe à l'heure actuelle un manque d'information sur le devenir des principes actifs des plantes médicinales une fois qu'elles ont été consommées, en particulier la nature des métabolites secondaires et leur distribution après passage de la barrière intestinale.

Notre projet s'inscrit dans l'étude de la bioactivité des préparations de plantes médicinales utilisées traditionnellement dans le contexte de perturbations métaboliques, notamment les dyslipidémies favorisant l'apparition de l'athérosclérose.

L'expérimentation que nous souhaitons réaliser a pour but d'étudier la bioactivité et la biodisponibilité des principes actifs d'une plante médicinale sur un modèle murin (apoE-/-) présentant des lésions athéromateuses. Cette expérience est une expérience pilote.

La plante médicinale choisie pour notre étude est *Psiloxylon mauritianum*, elle est consommée traditionnellement sous forme de tisane et inscrite à la Pharmacopée Française (Liste A). Au cours de notre étude, deux échantillons de cette espèce provenant de deux terroirs différents et ayant été traités (séchage, broyage) différemment seront utilisés.

Notre stratégie d'étude est la suivante

Après une semaine d'habituation par gavage à l'eau, les souris consommeront des tisanes de plantes médicinales par gavage à raison de 3 gavages de 50µL par semaine. Ces opérations se feront sur une durée de 2 semaines. Cette opération sera effectuée par un personnel qualifié et compétent du laboratoire.

Afin de réaliser cette étude, nous avons sélectionné 13 souris apoE-/- présentes au laboratoire et ayant un âge moyen variant entre 9 et 24 mois.

La complexité du métabolisme et de l'intervention de différents facteurs biologiques rend l'étude de la biodisponibilité difficile en dehors du modèle humain ou animal. L'expérimentation animale s'avère nécessaire dans notre cas. En effet, elle permet d'avoir des informations qualitatives et quantitatives sur le devenir des principes actifs une fois métabolisés par un organisme. En outre, l'étude de la biodistribution implique la mise à mort de l'animal et le prélèvement des organes d'intérêt, difficilement transposable à une expérimentation sur l'homme.

Afin d'appliquer la méthode des 3Rs nous avons choisi

*D'optimiser le nombre d'animaux utilisés pour l'expérience et de réaliser des groupes de 4 souris par condition test et un groupe de 5 souris pour le groupe « Control ». (témoin négatif). L'expérience se fera en plusieurs phases afin d'éviter la mise à mort de souris (prises de sang avant, pendant et à la fin de l'expérience. (Réduction)

*Avant le début de l'expérimentation, les souris utilisées en expérimentation suivront une étape d'habituation pendant une semaine afin d'être familiarisées à la procédure de gavage et à la procédure de mise à jeun. (Raffinement)

*Une alternative à l'expérimentation animale a été recherchée mais les méthodes possibles (digestion *in vitro*, analyse d'échantillons fécaux, étude chez l'Homme) ne permettent pas de répondre de façon précise à nos problématiques. Une étude complète de la biodisponibilité, biodistribution et bioactivité nécessite des observations sur un organisme entier. (Remplacement)

Le modèle d'étude à partir d'extraits de plantes a déjà été validé et utilisé dans le cadre d'autres projets de recherche du laboratoire. Bien que la technique de gavage peut induire un stress chez la souris, celui-ci peut être amoindri grâce à l'expertise du personnel et l'habituation de la souris. L'intérêt de ce modèle réside dans le fait qu'il permet de mimer correctement la consommation chronique de tisane tout en évitant le biais qui pourrait être apporté par la différence de régime alimentaire inter-individuel (biais possible dans les études chez l'Homme). De plus, ce modèle nous offre la possibilité d'explorer la biodistribution des principes actifs dans différents organes cibles, en particulier dans l'aorte des souris présentant des plaques d'athérome. Enfin, cette étude participe à la valorisation de l'effet biologique de certaines plantes médicinales en vue de la mise en place d'une thérapie innovante utilisable dans le contexte Dyslipidémie/Athérosclérose.

15327 La luzerne a une valeur nutritionnelle intéressante pour l'alimentation des chevaux, notamment grâce à sa forte teneur en protéines qui sont essentielles au bon développement musculaire de l'athlète. De plus, c'est une matière première produite en France et d'intérêt environnemental. Cependant peu de travaux ont été menés sur l'influence de la luzerne sur la performance sportive et le développement musculaire du cheval. Par analogie à ce qui est connu dans d'autres espèces, elle pourrait aussi permettre de limiter la fonte musculaire lorsque le cheval arrête son entraînement pour diverses raisons. Le présent projet vise à déterminer l'effet de la substitution d'une partie des céréales de la ration du cheval par de la luzerne sur ses performances sportives et son développement musculaire pendant une période d'entraînement suivie d'une période d'inactivité physique.

L'étude se déroule en deux phases une phase d'entraînement de neuf semaines et une d'inactivité physique de huit semaines. Les chevaux inclus dans l'étude sont seize hongres Trotteurs Français adultes. Deux lots homogènes de six chevaux, l'un recevant une ration traditionnelle et l'autre une ration avec de la luzerne sont entraînés selon un programme défini. Un troisième lot de quatre chevaux non entraînés reçoit le régime luzerne. Les trois lots de chevaux sont conduits en parallèle durant toute l'étude. Ce dispositif permet de répondre au principe de réduction en limitant le nombre d'animaux inclus dans l'étude tout en ayant la puissance statistique nécessaire pour mettre en évidence l'effet de la luzerne sur les performances sportives des chevaux et leur développement musculaire. En effet, les chevaux sont conduits en conditions contrôlées et uniformes afin de minimiser les variations liées à l'environnement. Le remplacement de l'équin par un autre modèle animal ou par un essai *in vitro* ne permettrait pas d'obtenir des résultats utilisables chez le cheval athlète.

Afin d'évaluer les capacités sportives des chevaux, la semaine précédent le début de la phase d'entraînement, ainsi que la dernière semaine de la phase d'entraînement et de désentraînement, les douze chevaux entraînés réalisent un test monté. Durant ce test les paramètres cardiorespiratoires sont mesurés grâce à un cardiofréquence-mètre et un système de mesure des échanges gazeux portable. Le métabolisme des chevaux est évalué grâce à des paramètres sanguins l'acétate avant le test et l'évolution de la glycémie et de la lactatémie des chevaux avant l'effort et dans les trente minutes suivant le test. Pour cela un prélèvement sanguin est réalisé via

la veine jugulaire avant le départ sur le test, puis en cinétique dans les trente minutes suivant la fin du test. Il y a donc six prises de sang par test et les tests sont espacés d'au moins six semaines.

De plus, l'évolution de la masse musculaire est estimée toute les deux semaines par un suivi échographique au niveau du fessier, et trois biopsies musculaires sont réalisées pour observer la structure de ce muscle avant la phase d'entraînement, à la fin de celle-ci et à la fin de la phase de désentraînement. Dans une optique de raffinement ces manipulations sont effectuées dans un travail adapté à la contention des chevaux pour éviter tout risque de blessure. En outre, pour les biopsies les chevaux sont tranquilisés et une anesthésie locale est pratiquée.

Avant le début de l'essai tous les chevaux sont vus par un dentiste équin et un ostéopathe animalier afin de s'assurer qu'ils sont aptes à être entraînés montés. Pendant toute la durée de l'essai, les chevaux vont au paddock quotidiennement. Ceci permet de respecter leur bien-être. Au quotidien, le personnel animalier observe le comportement de chaque cheval le matin au moment de la distribution du repas afin de repérer les signes de mal-être ou de souffrance. Ces signes inhabituels sont immédiatement signalés au responsable de l'expérimentation.

Les chevaux qui présenteraient des signes de mal-être ou de souffrance seront soignés et si jugé nécessaire par le vétérinaire traitant retirés de l'essai.

15328 L'ostéosarcome est un cancer rare et très agressif qui touche principalement les enfants, et parfois les adultes, souvent jeunes (20 à 30 ans). Une tumeur se développe au niveau des os et métastase au poumon. Rien qu'en France, on compte environ 200 cas par an. Cette maladie est le plus souvent fatale, et il existe très peu d'options thérapeutiques pour tenter de la combattre.

Une nouvelle classe de médicaments est développée qui peuvent être actifs sur cette maladie ainsi que sur d'autres cancers graves. Pour pouvoir réaliser un essai clinique de ces médicaments, il est nécessaire de justifier à la fois de leur efficacité et de leur sécurité d'emploi. Ceci répond à une double exigence d'une part réglementaire, car il y a une nécessité d'une étude chez l'animal pour justifier une demande d'essai clinique, et d'autre part éthique, car il est inenvisageable de donner des médicaments à des enfants sans avoir écarté tous les doutes possibles sur leur dangerosité.

Pour une étude pré-clinique en cancérologie, il est essentiel d'étudier les agents médicaments sur un modèle animal, parce qu'aucun autre modèle n'est aussi proche de la complexité d'un organisme humain.

Tout au court de ce projet, les précautions seront prises pour stresser au minimum l'animal.

Dès leur arrivée, les animaux seront hébergés par cage de 5 individus.

Toutes les procédures chirurgicales seront effectuées sous anesthésie générale et après administration d'un analgésique. Afin de limiter le nombre d'injection faite à la souris, les composés suffisamment stables dans l'eau seront administrés dans l'eau de boisson.

L'administration d'anesthésique, d'analgésique et d'antalgique, un suivi adapté des animaux et la définition précise des points limites précoces et prédictifs d'un mal être, permettent de limiter au maximum la souffrance animale.

Le but de ce projet est de pouvoir proposer une amélioration du traitement des maladies lourdes telles que l'ostéosarcome.

Dans ce projet, au maximum 268 souris seront utilisées et réparties dans 2 procédures expérimentales. Le nombre d'animaux a été réduit au minimum mais dans des mesures satisfaisantes pour pouvoir conclure de façon statistiquement significative à l'efficacité des médicaments. Ce projet s'articulera en plusieurs étapes.

15329 La majorité des maladies infectieuses émergentes dans le monde sont dues à des virus enveloppés (Arbovirus, Rétrovirus, Rhabdovirus, Coronavirus...). Ainsi, les virus du Chikungunya (CHIKV), du Zika (ZIKV), de la Dengue (DENV), Ebola, de la grippe et le VIH sont responsables d'épidémies majeures. Ces virus sont responsables d'infections invalidantes ou même mortelles chez l'homme. Ainsi, le Coronavirus SARS-Cov 2 (Covid-19) est actuellement responsable d'une pandémie qui touche plusieurs centaines de milliers d'individus et qui a déjà entraîné plusieurs dizaines de milliers

de décès. Même si le développement d'un vaccin est trop lent pour répondre aujourd'hui à l'actuelle pandémie, il est indispensable si la pandémie se maintient encore plusieurs mois ou si un nouvel épisode pandémique a lieu dans un an ou plus. Actuellement, la majeure partie des vaccins sont développés à partir de culture de virus, ce qui demande des structures industrielles confinées énormes et très coûteuses. De tels vaccins, peuvent présenter des risques qui peuvent être difficiles à maîtriser et il faut de nombreuses expérimentations pour s'assurer de leur innocuité ou, pour le moins, d'un niveau de sûreté satisfaisant. Pour les virus enveloppés, la mise en place de nouvelles générations de vaccins plus rapide à développer, moins coûteux et plus stables est une nécessité. Nous avons créé une nouvelle génération de vaccins sans virus ni adjuvant, qui est basée sur la présentation d'antigènes viraux par des exosomes, nanovésicules naturelles transmettrices d'information dans nos corps et qui possèdent une activité immunostimulatrice (= adjuvante) naturelle. De premières séries d'immunisations avec les antigènes majeurs de différents virus enveloppés ont démontré le potentiel énorme des exosomes comme plateforme vaccinale; nous avons effectivement obtenu le déclenchement de réponses immunes humorales neutralisant les virus correspondant (VIH, CHIKV, ZIKV). Il est remarquable de constater que ces réponses potentiellement protectrices ont toutes été obtenues sans utilisation de virus ni adjuvant, et à partir d'un matériel aisé à développer en milieu de très faible confinement. Nos résultats démontrent que les exosomes peuvent réellement apporter une solution universelle en étant une plateforme vaccinale unique sur laquelle il suffit de greffer un nouvel antigène viral pour obtenir un nouveau vaccin.

Notre programme propose de développer rapidement un candidat vaccin contre le SARS-Cov 2 à partir d'exosomes présentant sa protéine S (Spike), antigène majeur des Coronavirus. Deux types "d'immunogènes" seront testés le premier consiste en des exosomes porteurs de la protéine Spike et le second sera de l'ADN qui code pour cette protéine Spike ciblée in situ sur les exosomes de l'animal injecté.

En ce qui concerne le "Remplacement" de la règle des 3R, nous pouvons affirmer que le remplacement des modèles animaux n'est pas possible ici et que l'étude des réponses immunitaires et des protections naturelles nécessitent l'utilisation de modèles animaux. La vaccination expérimentale chez la souris commune *Mus musculus*, s'impose comme un modèle expérimental pour tester l'immunogénicité et la protection donnée par des candidats vaccins contre ces virus enveloppés. L'immunogénicité des candidats vaccins sera testée chez la souris adulte BALB/c qui est une souris immunocompétente.

Conformément à la règle des 3R, nous procédons à une "Réduction" au maximum le nombre d'animaux utilisés, avec des essais d'immunogénicité impliquant un effectif total de 72 souris. Nous prévoyons de tester 3 protocoles différents (plus un contrôle négatif) combinant différentes préparations antigéniques et un schéma d'immunisations qui a montré son efficacité lors des immunisations antérieures à base d'exosomes. Ces animaux sont répartis afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs ainsi, nous utilisons des groupes de six (6) individus pour chaque condition de l'étude c'est un nombre de souris relativement réduit, mais la bibliographie et toutes nos études antérieures ont montré qu'il permettait d'obtenir des résultats statistiquement significatifs avec nos immunogènes à base d'exosomes. Les animaux recevront les immunogènes par voie intradermique (ADN), intrapéritonéale (ADN) ou sous-cutanée (protéine pure ou sur exosomes).

Pour nous conformer au "Raffinement" de la méthode préconisée par la règle des 3R, nous avons mis en place des points limites pour d'éventuels signes d'inconfort, de stress ou de douleur cela permet de garantir au mieux le bien-être des animaux. L'utilisation de souris BALB/c peu fragiles devrait garantir aussi le bien-être de ces animaux.

15330 Le but de ce projet est de déterminer le potentiel thérapeutique de nouveaux pansements dans le traitement d'une plaie chronique de souris diabétique.

12 à 25 % des patients diabétiques développeront au cours de leur vie un ulcère des extrémités inférieures. Il s'agit d'un problème majeur de santé publique associé à une diminution substantielle

de qualité de vie, voire même de l'espérance de vie. Il n'existe aujourd'hui aucun pansement efficace permettant de favoriser la cicatrisation de ces plaies.

La complication majeure du pied de diabétique reste aujourd'hui encore l'amputation. L'augmentation constante de la prévalence du diabète dans nos pays occidentaux font que l'impact économique des ulcères du pied de patients diabétiques et des amputations associées est considérable (20% des dépenses totales sont associées au diabète) et ne cesseront encore de croître dans un avenir proche.

Les traitements actuels sont malheureusement inadéquats et permettent simplement de limiter les complications potentielles. La prise en charge du pied de diabétique nécessite une approche multidisciplinaire utilisation de chaussures de décharge, détersion et nettoyage de la plaie associée ou non à une thérapie antiseptique. De nouvelles approches existent, néanmoins les résultats sont plus ou moins contrastés et les coûts pour les patients restent très élevés. Citons notamment l'oxygénothérapie hyperbare, l'utilisation de facteurs de croissances et les produits d'ingénierie tissulaire.

Le but de cette étude est de tester de nouveaux pansements qui vont permettre d'accélérer la cicatrisation des plaies et éviter les amputations.

Afin de satisfaire avec les exigences de la règle des 3R, différentes stratégies ont été mises en place. Tout d'abord dans un but de remplacement, les pansements ont été choisis après des tests réalisés *in vitro*. Dans un but de réduction nous avons estimé le nombre d'animaux strictement nécessaire fondé sur un calcul de puissance statistique et basé sur notre expérience des résultats précédents. Enfin dans un but de raffinement, nous avons établi des points limites précoces et suivons les animaux 1 ou 2 fois par jour. De plus, nous avons raffiner le protocole d'épilation permettant d'éviter l'anesthésie, le stress et des lésions cutanées qui pourraient interférer avec les résultats.

Cette étude sera réalisée sur des souris diabétiques db/db (132 au total).

15331 Le tractus gastro-intestinal est colonisé par un très grand nombre de microorganismes qui constituent le microbiote intestinal. Ce microbiote joue de nombreux rôles bénéfiques pour son hôte. Cependant, s'il est perturbé, il peut conduire à de nombreux effets délétères, notamment de l'inflammation intestinale. Des études récentes ont montré que le microbiote intestinal était un facteur important dans l'apparition de nombreuses pathologies avec une incidence en augmentation, telles que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, les dérégulations métaboliques et le cancer colorectal. De nombreux facteurs environnementaux et alimentaires peuvent modifier le microbiote intestinal, mais les mécanismes exacts et les conséquences sur la santé digestive et métabolique restent peu connus.

C'est dans ce cadre que s'inscrit ce projet de recherche, qui vise à mieux comprendre, via l'utilisation du modèle souris, comment le microbiote intestinal est régulé et les mécanismes par lesquels il contribue à l'inflammation intestinale chronique. Le modèle souris présente de nombreux avantages dans l'étude du microbiote intestinal, car de nombreuses approches telles que l'utilisation de perturbateurs du microbiote, comme les antibiotiques, ainsi que le recours à des souris sans microbiote peuvent aider à mieux comprendre ces relations hôte / microbiote.

Des modèles de microbiotes *in vitro* existent, permettant de mieux comprendre sa régulation, mais le recours au modèle souris est indispensable pour comprendre les interactions intestin / microbiote. En effet certains aspects de ces maladies inflammatoires complexes, dans laquelle les cellules impliquées sont autant immunitaires que non-immunitaires, ne peuvent être étudiés que chez l'animal. Ainsi, pour mieux étudier le complexe cellules épithéliales-cellules immunitaires-interactions microbiennes, ainsi que l'impact du microbiote intestinal sur le cerveau et le comportement, l'utilisation d'un modèle animal est nécessaire.

1242 souris seront utilisées par an sur une durée de 5 ans, soit 6210 au total, avec 8 approches expérimentales.

- 1) Injection de produits microbiens pour comprendre les mécanismes immunitaires impliqués dans la reconnaissance de molécules microbiens
- 2) Transplantation fécale pour comprendre comment un microbiote altéré peut conduire à de l'inflammation chronique
- 3) Surpeuplement social pour comprendre l'impact du stress sur le microbiote
- 4) Modification du régime alimentaire, pour moduler le microbiote intestinal
- 5) Induction de colites pour étudier le rôle du microbiote dans l'inflammation intestinale chronique
- 6) Infection bactérienne dans le but d'identifier l'impact de certaines bactéries sur le microbiote
- 7) Induction de cancer colorectal dans le but d'étudier le rôle du microbiote dans le cancer
- 8) Prélèvement sanguin pour dosage de cytokines et d'anticorps circulants.

Les phénotypes attendus ne portent pas atteinte à l'intégrité des souris et des points limites prédéfinis permettront d'éviter la souffrance animale. Le nombre d'expériences est limité à son minimum pour effectuer des tests statistiques probants et respecter la règle des 3R.

Une identification précoce des animaux et un étude statistique adaptée nous permettront de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en préservant la significativité des résultats obtenus. Dans un souci de raffinement, un suivi étroit des animaux et des points limites précoces et adaptés seront mis en place tout au long des expérimentations. De plus, toutes les cages seront enrichies en coton afin de favoriser le bien-être animal.

La réalisation de ce projet de recherche nous permettra d'avancer significativement nos connaissances sur le microbiote intestinal, sa régulation, et les mécanismes par lesquels il peut promouvoir la maladie.

15332 Depuis la re-émergence en 2005 du virus Chikungunya (CHIKV) à l'île de la Réunion, ce virus s'est propagé dans le monde entier via des voyageurs humains infectés et la présence des moustiques vecteurs, depuis les zones intertropicales jusqu'aux pays tempérés tels qu'en Italie (en 2007 et 2017) et en France (en 2010 et 2014). Depuis 2010, des épidémies récurrentes de Chikungunya ont eu lieu dans plus de 70 pays, entraînant plusieurs millions de cas (1,5 à 3 millions en Inde et autant en Amérique du Sud ou aux Antilles). L'infection aiguë peut conduire à la mort dans 0,2% des cas, particulièrement chez les personnes âgées et les nourrissons infectés à la naissance. La complication majeure reste l'évolution vers une maladie chronique associée à une persistance du virus dans les tissus. Cette chronicisation a un impact économique et sanitaire important. Ainsi, à La Réunion, 12 ans après l'épidémie, plus de 5 % des personnes infectées ont encore des séquelles. Parallèlement en Amérique du Sud, une partie importante de la population est exposée à un virus apparenté, le virus Mayaro, qui induit la même maladie. Les deux virus étant du même séro groupe, la réponse immune contre le virus Chikungunya peut aussi protéger contre le virus Mayaro. A ce jour, la prise en charge des patients infectés par l'un ou l'autre des virus reste limitée à la surveillance et à des traitements symptomatiques antalgiques, antipyrétiques, maintien des fonctions vitales.

Il n'existe toujours pas de traitement antiviral spécifique de l'infection. Si de nombreux candidats vaccins ont été étudiés, seuls quelques-uns ont dépassé le stade de l'évaluation préclinique pour des essais chez l'humain.

Notre programme est destiné à l'évaluation pré-clinique d'un nouveau vaccin contre le virus Chikungunya et Mayaro chez les primates non humains (PNH), modèle animal le plus pertinent de l'infection de l'humain par le virus du Chikungunya, en termes d'expression de la maladie et de réponse immunitaire. Les résultats de cette étude préclinique sont absolument nécessaires pour décider de son évaluation clinique chez l'humain.

Le projet prévoit au maximum 28 PNH nés dans des élevages agréés et élevés à des fins scientifiques. Le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux est réduit au minimum nécessaire tout en restant compatible avec l'utilisation de tests statistiques pour l'interprétation des résultats. Il s'agit ici de vérifier l'absence de persistance de composants du vaccin après administration et de valider l'efficacité de la protection en fonction de la réponse de l'hôte au vaccin.

Les méthodes de vaccination (intramusculaire ou sous-cutanée) et les prélèvements de sang nécessaires au suivi expérimental ont été choisis pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux, injections et prélèvements de sang et biopsies sous anesthésie, limitation des volumes de sang prélevés.

En cas d'apparition d'effets inattendus, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés. Des critères d'arrêt de procédure sont prévus dans le projet. Les animaux seront hébergés en groupe avant infection, puis en hébergements individuels contigus permettant des interactions sociales visuelles, auditives et olfactives. Ils bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la cellule de l'établissement en charge du bien-être animal. Des échantillons biologiques produits dans ce projet seront partagés avec d'autres laboratoires afin de limiter le recours au modèle PNH.

15333 But du projet : Recherche appliquée et translationnelle

Les liens entre le système nerveux central (SNC) et l'intestin sont de plus en plus étudiés en neurosciences. En effet, il a récemment été décrit que le statut inflammatoire de l'intestin a une influence sur le cerveau (et inversement).

L'imagerie moléculaire est couramment utilisée dans notre laboratoire dans l'étude de l'inflammation vasculaire du système nerveux central. Cette technique consiste en l'injection intraveineuse de micro-billes de fer (MPIOs) couplées à des anticorps spécifiques de la protéine vasculaire étudiée. Ici, les protéines étudiées sont celles impliquées dans l'infiltration des cellules immunitaires à travers la paroi vasculaire. Or, il se trouve que ces protéines ne sont pas seulement exprimées par les vaisseaux sanguins du SNC, mais également par les vaisseaux de l'intestin. La difficulté de l'imagerie IRM de l'intestin réside dans la présence de poches de gaz et dans les mouvements autonomes de ce dernier. Ce projet a pour but de développer un protocole permettant d'imager de façon précise l'inflammation vasculaire de l'intestin chez la souris. Pour cela, deux protéines d'intérêt seront étudiées : vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) et mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MadCAM-1).

Cette étude basée sur l'expérimentation animale prend en compte le bien-être animal et les pratiques éthiques, et répond à la règle des 3 R (remplacer, réduire, raffiner) comme décrit ci-dessous.

La communauté scientifique dispose pour ces études de modèles murins reproduisant les pathologies inflammatoires de l'intestin. L'ensemble des connaissances et des acquis dont nous disposons au laboratoire et dans la littérature grâce à ces modèles rend la souris particulièrement intéressante pour ce projet. Notre projet ne nous permet pas d'utiliser d'autres moyens que l'expérimentation animale.

Les principes éthiques et les standards de raffinement sont utilisés de la naissance à la mort de l'animal. Les animaux sont hébergés dans des cages standards aux normes européennes. Le bien-être des animaux est contrôlé 7j/7 par du personnel qualifié. Cette surveillance quotidienne et hebdomadaire permet de détecter tous signes cliniques de souffrance (douleur, perte de poids ...) et d'agir rapidement pour mettre fin à cette détresse. L'expérience de l'équipe de recherche sur l'inflammation permet d'appliquer au quotidien le raffinement des conditions de manipulation de ces animaux. De plus, le nombre d'animaux a été réduit en prenant en compte les tests de puissance statistique réalisés.

En s'appuyant sur nos précédents projets et sur les données disponibles dans la littérature, nos estimations du nombre d'animaux utilisés (100 animaux au total) sont faites de manière à réduire au maximum ce dernier. Ainsi, le nombre de souris prévues dans le projet est le strict minimum nécessaire afin de bénéficier d'une puissance statistique suffisante, tout en réduisant au maximum le nombre d'animaux. Par ailleurs, l'utilisation d'une méthode non-invasive de mesure de l'inflammation intestinale (IRM moléculaire) permet de diminuer le nombre d'animaux nécessaires dans les études longitudinales.

Les souris sont suivies quotidiennement par un personnel qualifié. Plusieurs fois par jours, un contrôle du bien-être animal est réalisé sur l'ensemble des animaux utilisés dans ce projet. Tous les

moyens pouvant contribuer à la diminution de la souffrance animale seront utilisés au cours de ce projet.

Mots clefs Inflammation, intestin, système nerveux central

15334 Le rôle du microbiote sur le risque de surpoids a été révélé par l'observation de différences entre populations bactériennes de souris obèses et de souris saines qui consommaient le même régime alimentaire.

Ce rôle a été confirmé par des transferts fécaux. Le transfert du microbiote de souris obèses a provoqué une prise de poids chez des souris initialement axéniques. Le transfert du microbiote de souris obèses puis ayant maigri après une intervention de chirurgie bariatrique a provoqué une perte de poids chez des souris obèses non opérées. Chez l'homme, la transplantation du microbiote d'un donneur en bonne santé mais en surpoids s'est ensuivi d'une prise de poids chez le receveur (qui souffrait initialement d'entérite chronique). Enfin, le transfert de microbiote d'individus maigres a provoqué une amélioration de la sensibilité à l'insuline chez des receveurs souffrant du syndrome métabolique.

Parmi les mécanismes pouvant expliquer l'effet du microbiote, il a notamment été évoqué une meilleure extraction de l'énergie des aliments (absorption d'acides gras à chaîne courte issus de la fermentation colique). Le microbiote est également impliqué dans la survenue de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et dans l'instauration d'une inflammation systémique. Ceci s'expliquerait par le rôle de certains microorganismes dans le maintien ou l'altération de l'intégrité de la barrière intestinale. Une modification du microbiote, en altérant l'expression des protéines des jonctions serrées, augmenterait la perméabilité intestinale et permettrait le passage transpariétal de composants des parois bactériennes qui induiraient un processus inflammatoire subclinique responsable, à son tour, d'une baisse de la sensibilité à l'insuline. Ce lien entre microbiote et sensibilité à l'insuline a été établi par des manipulations de transfert de microbiote.

Toute intervention permettant une perte de poids, une correction de l'inflammation systémique, ou une amélioration de la sensibilité à l'insuline contribuerait à la correction des perturbations liées au surpoids. L'intervention nutritionnelle représente à cet égard une alternative thérapeutique sérieuse.

Dans la première partie de l'étude, nous évaluerons les effets de la spiruline à l'égard du poids, du statut inflammatoire et métabolique (effets décrits dans des modèles d'obésité). Nous souhaitons étudier l'effet de la spiruline distribuée quotidiennement à hauteur de 1,8% de la ration journalière. Par ailleurs, nous évaluerons également les effets du curcuma seul à hauteur de 0,77% de la ration sur les paramètres métaboliques des chiens en surpoids (suite aux résultats que nous avons obtenus dans une précédente étude, avec 0,015% de curcuma, associé à du nutrioise). Dans la seconde partie, nous étudierons l'effet d'un ingrédient pouvant potentiellement améliorer l'efficacité de la perte de poids et la restauration des paramètres métaboliques lorsqu'il sera ajouté à un régime hypoénergétique.

Cette étude sera menée sur 30 Beagles qui auront tous, initialement, été nourris avec un régime hyperlipidique et maintenus à un niveau de surpoids stable pendant au moins 6 semaines.

Pour la première partie de l'étude, 30 chiens seront répartis en 3 groupes de 10, qui recevront, selon le cas,

- l'aliment hyperlipidique seul (témoin)
- l'aliment supplémenté de 1,8% de spiruline
- l'aliment supplémenté de 0,77% de curcuma

Pour chaque animal et tout au long de cette première étude, les rations seront adaptées chaque semaine de manière à maintenir un poids constant.

La seconde partie de l'étude sera également menée sur ces 30 chiens, répartis en 2 groupes de 15, qui recevront

- l'un un aliment hypoénergétique, à un niveau d'apport restreint de sorte à ce que les chiens perdent du poids jusqu'à retrouver un indice de condition corporelle (ICC) optimal (ICC5, sur une échelle de 1 à 9).

- l'autre, selon les mêmes modalités, le même aliment supplémenté d'un ingrédient fonctionnel, pour déterminer dans quelle mesure cet ingrédient permet de manière plus efficace aux chiens de retrouver, d'une part, un profil métabolique normal et, d'autre part, un ICC optimal.

Entre les deux parties de l'étude, une période de repos de 12 semaines sera observée, les chiens recevant l'aliment hyperlipidique à un niveau permettant de les maintenir un poids constant.

A l'issue de cette étude, les animaux pourront être proposés à l'adoption.

Avant et à la fin de chaque partie, la physiologie de l'hôte sera appréciée par la détermination de facteurs systémiques (poids, prise alimentaire, inflammation), de facteurs associés à l'épithélium intestinal, de la réponse de l'organisme à des stimulations exogènes (challenge tests). Par ailleurs, l'analyse du microbiote sera effectuée, à partir de selles fraîches, pour déterminer les caractéristiques des populations bactériennes et de leur métagénome ainsi que celles de l'activité fermentaire.

Ce projet respecte la règle des 3R

Remplacer Aucune manipulation *in vitro* ne permet de mesurer l'influence du régime sur le microbiote fécal et la physiologie de l'hôte. De plus, le chien est l'espèce cible.

Réduire Une précédente étude a montré que 10 chiens par groupe étaient nécessaires et suffisants pour une analyse statistique concluante.

Raffiner Le bien-être des animaux sera surveillé par une observation quotidienne. Les conditions d'hébergement et les méthodes expérimentales seront optimisées pour maintenir ce bien-être. Pendant les procédures expérimentales les animaux seront installés sur un tapis chauffant, l'analgésie sera assurée par la méthadone et les fréquences cardiaque et respiratoire, la saturation en O₂, la pression artérielle, la température seront mesurées en permanence.

15335 Avec le réchauffement climatique, les poissons d'élevage sont davantage exposés à des températures suboptimales lors des périodes cruciales du cycle de vie. Si les effets directs d'un stress thermique maternel sur la survie et les malformations des embryons sont bien documentés, l'impact sur les capacités adaptatives et le bien-être des alevins reste méconnu. Nous avons récemment montré chez la truite arc-en-ciel qu'une exposition maternelle à des températures élevées, mais néanmoins cohérentes avec les systèmes d'élevages actuels en période de réchauffement climatique, induisent des altérations émotionnelles et cognitives significatives chez les descendants. Les données génomiques dont nous disposons indiquent que ces altérations sont associées à une perturbation de l'expression maternelle, et dans une certaine mesure zygotique, de gènes associés au développement des fonctions neuronales et cognitives (notamment le gène *auts2*, activator of transcription and developmental regulator anciennement appelé autism susceptibility candidate 2). Ce projet vise à examiner de façon plus approfondie les mécanismes de transmission des effets d'une exposition maternelle à une température élevée pendant l'ovogenèse sur la plasticité comportementale des jeunes (apprentissage, réactivité émotionnelle) chez un poisson modèle, le médaka. En effet, les réponses cognitives et émotionnelles sont des composantes-clés du bien-être animal. Dans ce projet, deux lots expérimentaux seront comparés un lot témoin de géniteurs (12 femelles et 6 mâles) exposés à une température optimale pour l'espèce (27°C) et un lot exposé à une température suboptimale (33°C) pendant 4 semaines au cours de l'ovulation. Outre les phénotypes comportementaux des descendants (tests de réactivité émotionnelle et capacité d'apprentissage), nous analyserons le taux de fécondité, le succès d'éclosion et les éventuelles malformations embryonnaires. Afin de comprendre les mécanismes liés aux phénotypes comportementaux observés, nous analyserons également les profils d'expression des gamètes femelles et de la progéniture (ARN maternels, ARN non-codant, protéines et expression du gène *auts2*). L'analyse de la composition de l'œuf à différents stades embryonnaires est rendue possible par les spécificités biologiques du modèle (grand nombre de gamètes produits de façon synchrone tous les jours, contrairement aux mammifères).

Le projet nécessitera l'utilisation de 156 animaux au total 24 femelles et 12 mâles, puis 120 alevins seront observés pour l'analyse des phénotypes comportementaux 10 individus par femelle (x6 femelles seulement) et par lot.

Le projet respectera la règle des 3 Rs

- Remplacer Il n'existe pas d'alternative à cette expérimentation animale car nous recherchons précisément des mécanismes intervenant pendant une fécondation naturelle perturbée par des conditions de température suboptimale ainsi que les réponses comportementales adaptatives des poissons issus de cette fécondation
- Réduire Le nombre d'animaux est adapté au plus juste pour permettre des analyses statistiques fiables malgré les fortes variabilités du comportement entre les individus
- Raffiner Les animaux seront élevés dans les conditions optimales pour l'espèce (photopériode, qualité d'eau, densité) à l'exception du lot de géniteurs exposés à 33°C. Il s'agit cependant précisément de l'objet de l'étude (effet du réchauffement) et la littérature ne montre pas de mortalité chez des médakas élevés à cette température. Les bacs seront enrichis (ajout de plantes artificielles). Les descendants seront simplement filmés pour l'observation de leur comportement. Il n'y aura aucune procédure douloureuse.

15336 Le fonctionnement des reins est très consommateur d'énergie. Les maladies rénales entraînent une perturbation de la consommation d'énergie par les cellules du rein, ce qui impacte fortement l'évolution de la maladie. Le gène *Nupr1*, induit dans le rein par tout type d'agression, diminue la consommation énergétique des cellules rénales, améliore leur équilibre énergétique, accroissant ainsi leur survie. Cependant, d'autres études indiquent que *Nupr1* pourrait empêcher la réparation après agression. Notre hypothèse est que *Nupr1* favorise initialement la résistance aux agressions rénales (par diminution des besoins en énergie), mais qu'une fois l'agression terminée, il inhibe la réparation de l'organe (consommatrice en énergie).

Nous projetons de tester cette hypothèse *in vivo* chez la souris, dans un modèle animal reproduisant une agression dans le rein. Le modèle d'agression rénale que nous avons choisi d'utiliser est celui de l'ischémie-reperfusion, à savoir l'interruption de la circulation sanguine (ischémie) dans le rein pendant 20-30 minutes suivie du rétablissement de cette circulation (reperfusion).

Nous testerons les conditions suivantes dans ce modèle pour caractériser le rôle de *Nupr1*

- (1) comparaison des conséquences de l'ischémie-reperfusion sur la fonction et la structure du rein entre une souris normale et une souris ne produisant plus de *Nupr1*
- (2) comparaison des conséquences de l'ischémie-reperfusion sur la fonction et la structure du rein entre une souris normale et une souris produisant un excès de *Nupr1*
- (3) comparaison des conséquences de l'ischémie-reperfusion sur la fonction et la structure du rein entre une souris normale et une souris recevant une administration de *Nupr1*
- (4) comparaison des conséquences de l'ischémie-reperfusion sur la fonction et la structure du rein entre une souris normale et une souris recevant un inhibiteur ou un antagoniste de l'action de *Nupr1*.

Notre projet a été élaboré de façon à respecter au maximum la règle des 3R. Nous avons notamment réalisé une partie de la caractérisation du rôle de *Nupr1* dans la régulation de la dépense énergétique dans des modèles cellulaires *in vitro*. Ces travaux nous ont permis de poser les hypothèses décrites ci-dessus qu'il faut maintenant tester dans l'organe complexe qu'est le rein, composé de plusieurs types de cellules chargés chacun d'une mission spécifique (cellule épithéliale tubulaire, cellules de la paroi des vaisseaux et cellules du système immunitaire). Le nombre de souris nécessaires à notre étude (1420) a été calculé de sorte à réduire au maximum l'utilisation des animaux. Il tient compte des variations inter-individuelles et inter-expériences de la pathologie rénale, et de la nécessité d'utiliser des tests non paramétriques (la quantification des lésions rénales ne suivant pas une distribution normale). Il est nécessaire de prévoir par expérience 10 animaux dans chaque groupe, et d'effectuer 2 fois les expériences.

Le bien-être des animaux est assuré par un enrichissement de leur environnement grâce à l'utilisation d'une litière à base de cellulose composée de plusieurs éléments, de tailles différentes (matière compacte initialement, décompactée par les animaux) et de morceaux de bois à ronger. Les animaux sont observés quotidiennement. Si une agressivité est observée, des abris seront placés dans la cage.

Pour assurer le bien-être des animaux pendant et après la chirurgie, des antalgiques seront administrés avant et après l'opération, pendant 48h. La semaine suivant la chirurgie, les animaux seront examinés quotidiennement afin de pouvoir détecter tout signe de douleur et/ou problème de cicatrisation.

15337 Les différentes maladies, qui affectent l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR), entraînent des pertes sévères et rapides de la vision conduisant jusqu'à la cécité et affectent des millions de personnes dans le monde. La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA), qui représente la forme la plus commune de cécité dans les pays occidentaux (plus de 1,5 millions de personnes en France), est déclenchée par des causes environnementales et génétiques. Les rétinites pigmentaires (RP) sont des maladies d'origine monogénique et affectent des populations plus jeunes (200000 cas en France).

La perte des photorécepteurs est due au mauvais fonctionnement ou à la dégénérescence de cet EPR. Jusqu'à présent aucun traitement n'est disponible pour ces pathologies. La thérapie génique, qui peut rétablir certaines fonctions des cellules de l'EPR, est cependant rendue difficile par l'hétérogénéité des mutations causales.

Le protocole est proposé dans le cadre de l'évaluation du bénéfice fonctionnel d'un produit de thérapie cellulaire (PTC) après cryopréservation. Ce PTC est composé de cellules de l'EPR dérivées de cellules souches embryonnaires (cellules ES) humaines, et d'une membrane amniotique humaine servant de support.

Le PTC sera greffé dans l'espace sous-rétinien d'un modèle de rat présentant une dégénérescence rétinienne (rats RCS). Le bénéfice fonctionnel du PTC après cryopréservation sera comparé à celui du même PTC avant cryopréservation.

Au total, 106 animaux sont prévus pour cette étude

60 rats RCS, qui présentent une dégénérescence des photorécepteurs, seront utilisés pour l'évaluation de l'efficacité du PTC au cours du temps. 10 rats de la même lignée mais non-porteurs de la mutation et donc ne développant pas de dégénérescence des photorécepteurs, serviront de contrôles.

De plus, 36 rats immuno-déficients (athymic nude rats) seront utilisés dans l'évaluation de l'innocuité des cellules du PTC.

Conformément à la règle des 3R (réduction, raffinement et remplacement), afin de respecter la démarche éthique liée à l'expérimentation animale, le nombre d'animaux est réduit à son minimum pour obtenir des résultats statistiquement relevant. Quand cela est possible, plusieurs tests sont effectués sur les mêmes animaux. Ainsi, l'utilisation de l'imagerie rétinienne (tomographie par cohérence optique) et les approches d'analyses de la fonction rétinienne *in vivo* (test optomoteur et électrorétinogramme) permettront de suivre l'évolution par différentes mesures répétées de la dégénérescence des photorécepteurs au cours du temps sur un même groupe d'animaux (réduisant ainsi le nombre total d'animaux). De même, chaque animal n'est greffé que sur un œil, l'autre servant de contrôle, ce qui réduit d'autant le nombre d'animaux nécessaires pour obtenir des résultats statistiquement significatifs.

L'ensemble des procédures a été mise au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal, en limitant la douleur et le stress, tel que l'administration d'analgésiques opioïdes en pré et postopératoire afin de prévenir la douleur éventuelle due aux actes chirurgicaux. Les animaux sont stabulés dans les conditions conformes à la réglementation (portoirs ventilés dans des cages avec enrichissement, alimentation et abreuvement à volonté). Une signalétique particulière des animaux en expérimentation est utilisée. Une observation régulière des animaux est effectuée pour s'assurer du bien-être des animaux.

Cependant, ces études chez l'animal sont nécessaires car l'objectif de ce projet est le transfert vers une application clinique et ne peuvent donc être remplacées par des études *in vitro*.

15338 Ce projet vise à comprendre des facteurs qui pourraient altérer le fonctionnement des circuits neuronaux chez l'adulte ou chez le nouveau-né, pendant le développement normal ou face à une situation pathologique.

Nous testerons les effets d'un traitement non-invasif, la Stimulation Transcrânienne Magnétique répétée (rTMS) à faible intensité (LlRtMS, Low Intensity). Cette stimulation non-invasive applique des champs magnétiques au cerveau pour moduler l'excitabilité neuronale, mais sans activation électrique des neurones. Ce type de traitement peut changer la signalisation cellulaire, modifier des réseaux neuronaux, et provoquer une réparation post-lésionnelle. Ce type de stimulation est déjà utilisé en clinique chez l'Homme pour des maladies neuropsychiatriques. Nous allons tester les effets de différents protocoles de cette stimulation sur un modèle murin de neuro-développement normal ou pathologique, et chez l'animal adulte, pour trouver des traitements potentiels pour des pathologies distinctes et pendant des stades de la vie différentes (enfance, adulte etc).

Nous allons utiliser l'hypoxie, avec des protocoles qui miment différentes pathologies humaines, et étudier les effets de la LlRtMS sur le comportement animal, l'histologie du cerveau et sur l'expression génique. On testera si le traitement LlRtMS peut être envisager comme traitement pour des pathologies induites par l'hypoxie cérébrale, et quels patrons de stimulation sont efficaces. A long-terme notre projet devrait permettre la mise en place d'interventions cliniques plus précises et plus efficaces.

Dans la mesure du possible, le remplacement des animaux par des méthodes alternatives (modèles mathématiques, méthodes *in vitro* ...) est préféré. Mais le cerveau est une structure complexe avec de très nombreuses connexions, impossible de reproduire complètement en culture, et les modèles mathématiques ne permettent pas l'identification de protocoles de stimulation non invasive pour favoriser le bon fonctionnement des circuits neuronaux.

Le design des expériences comportementales a été étudié au plus juste. Nous avons ainsi réduit le nombre total d'animaux utilisé : en effet, des études antérieures ont montré que 15 animaux par groupe expérimental permettent de détecter un effet du traitement par des analyses statistiques (ANOVA, t-test) sur le comportement modifié grâce à ce traitement. Pour minimiser le nombre d'animaux utilisé, nous étudions leur comportement avant de les euthanasier pour les analyses anatomiques, électrophysiologiques, ou moléculaires donc mettant au maximum l'usage de chaque animal. Enfin, le raffinement des méthodes expérimentales, afin de réduire à son maximum le stress des animaux, est mise en œuvre. L'ensemble des expériences est mené par des personnels hautement qualifiés, et dans des locaux d'hébergement respectant les standards en vigueur.

Nous prévoyons deux études en parallèle pendant le premier mois de vie postnatal chez la souris, et une 3ème étude chez la souris adulte. Dans les trois études, il y aura un traitement par hypoxie (ou sham); un traitement par LlRtMS (ou sham); des tests de comportement, avec 10 animaux par groupe; et des évaluations de l'histologie et de l'expression génique, avec 5 animaux par point (c'est-à-dire par l'âge, génotype et traitement). Ces expériences requièrent 2970 souris en total.

Dans chacun des trois études, nous utiliserons des souris génétiquement normal ("wild-type", souche C57/Bl6J) mais aussi 2 lignées transgéniques :

1) RORa hétérozygotes Le récepteur nucléaire RORa régule plusieurs fonctions cellulaires et joue un rôle clé dans le développement du cerveau, en particulier le cervelet. Les animaux hétérozygotes (RORa+/-) sont un modèle potentiel de l'autisme. Nous souhaitons voir si l'hypoxie a des effets plus importants chez ce mutant, et si la LlRtMS peut pallier à ces effets.

2) Cryptochrome Knock-outs Les protéines cryptochrome du cycle circadien sont ainsi des magnétorécepteurs. Chez cette souche, les effets de la LlRtMS devraient être modifiés ou absents.

15339 La dystrophie myotonique de type 1 (DM1) est une des maladies neuromusculaires les plus fréquente chez l'adulte. Elle est caractérisée par une myotonie, une faiblesse musculaire progressive, des troubles cardiaques ainsi que cognitifs. La DM1 est causée par l'expansion de répétitions CTG dans la partie 3' non-codante du gène DMPK (DM Protein Kinase). Cette mutation génétique conduit à la perte de fonction des protéines de la famille MBNL et conduisent ultimement, à des symptômes cliniques. La famille des protéines MBNL est composée de MBNL1, MBNL2 et

MBNL3. MBNL1 est majoritairement exprimé dans le muscle squelettique, cardiaque et le cerveau, MBNL2 est principalement retrouvé dans le cerveau. Alors que la fonction de MBNL1 et MBNL2 au niveau du muscle squelettique et du cerveau est extensivement étudié à ce jour, leurs rôles au niveau la moelle épinière et plus particulière dans les motoneurones ne sont pas connus. Les motoneurones vont innerver le muscle squelettique et commander sa contraction. L'objectif du projet est de déterminer *in vivo* la contribution de la perte de fonction de MBNL1 et MBNL2 spécifiquement dans les motoneurones et sa contribution aux atteintes musculaires observés chez les patients DM1. Pour ce projet, nous avons développé une lignée de souris triple-transgénique (Hb9-MBNL1/2) permettant la déplétion de Mbnl1 et Mbnl2 spécifiquement dans les motoneurones (MN-dKO).

Plusieurs questions seront adressées au cours des 5 ans de ce projet

- Effets moléculaires de la déplétion de MBNL1 et/ou 2 dans les motoneurones chez la souris à différents âges.
- Effet de la déplétion de MBNL1 et/ou 2 dans les motoneurones sur la formation et le maintien des connexions nerf-muscle via les jonctions neuromusculaires, et la formation et la structure du muscle squelettique chez la souris à différents âges.
- Effet de la déplétion de MBNL1 et/ou 2 dans les motoneurones sur la fonction du muscle squelettique chez la souris à différents âges.

Au total, l'ensemble de ce projet de recherche d'une durée de 5 an nécessitera l'utilisation de 480 souris tous génotypes, âges et des sexes confondus.

Les procédures décrites prévoient l'utilisation de souris en adéquation avec la règle des 3R.

1- Remplacer Des modèles cellulaires *in vitro* pour l'étude des motoneurones dans la DM1 ont déjà été développés. Cependant l'évaluation de l'impact de la perte de fonction de Mbnl1 et Mbnl2 spécifiquement dans les motoneurones sur la fonction musculaire nécessite des modèles *in vivo* de souris reproduisant ce phénomène. Enfin, aucune méthode de remplacement n'existe pour évaluer un muscle mature, une connexion motoneurone-muscle mature ou pour mesurer la force que le muscle est capable de produire lors de contractions.

2- Reduire Afin de réduire et d'optimiser le nombre d'animaux, le protocole d'étude proposé a été développé avec une réduction du nombre d'animaux utilisés dans la mesure où toutes les souris obtenues lors de nos croisements pour générer notre modèle MN-dKO seront analysées et constituent les contrôles nécessaires à cette étude (souris sauvages, invalidées pour MBNL1 seulement (MBNL1 KO), invalidées pour MBNL2 seulement (MBNL2 KO) et invalidées pour MBNL1 et MBNL2 (dKO). De plus, différentes évaluations phénotypiques se feront au cours de la vie des souris à différents âges.

3- Raffiner Toutes les précautions seront prises afin de réduire à son maximum le stress et la souffrance animale. L'entretien des souris ainsi que les différents protocoles expérimentaux seront assurés par du personnel qualifié et le bien-être des animaux sera amélioré par la mise en place d'un enrichissement de milieu. Les procédures invasives seront réalisées sous anesthésie/ analgésie.

15340 Les maladies neurodégénératives comme la maladie de Huntington (MH) sont une préoccupation croissante en santé publique. Malgré d'importants efforts de recherche, il n'existe encore aujourd'hui aucun traitement capable de combattre de façon efficace la progression de ces maladies.

Des nouvelles approches thérapeutiques sont essentielles pour progresser dans la prise en charge des patients. Parmi ces nouvelles approches prometteuses se trouve la thérapie génique. Elle utilise l'ADN pour soigner ou prévenir de la maladie. Selon la pathologie, cet objectif peut être atteint en délivrant aux cellules un gène à action thérapeutique (transgène) qui surexprime la protéine déficiente dans la maladie. Ces acides nucléiques sont le plus souvent transportés dans les cellules grâce à un vecteur viral.

Nous avons déjà la preuve de concept de notre stratégie dans des modèles murins pour les maladies neurodégénératives suivantes :

-La maladie d'Alzheimer : la surexpression de l'enzyme clé du métabolisme cérébrale du cholestérol à l'aide d'un vecteur (de type AAV) dans les régions précocement atteintes par la pathologie chez des souris modèles (amyloïde et tau) permet de restaurer les déficits mnésiques.

-La maladie de Huntington : La surexpression de cette même enzyme à l'aide d'un vecteur AAV permet de corriger les anomalies neuropathologiques et comportementales chez la souris modèle.

Le but principal est de tester l'efficacité et trouver la dose efficace minimale d'un AAV exprimant le gène thérapeutique (CYP46A1) sous contrôle d'un promoteur qui cible les neurones dans la région cible du cerveau (striatum) du modèle murin pour la MH afin d'évaluer l'effet du traitement sur la neuropathologie et sur les fonctions motrices. De plus, les niveaux de plusieurs biomarqueurs de la MH, présents au niveau du sang seront analysés. A la fin de l'étude les souris seront euthanasiées.

Remplacement : Le recours aux modèles animaux est essentiel, car aucun type de culture cellulaire ou système synthétique ne permet à ce jour de reproduire la complexité architecturale des cellules du cerveau en particulier leurs interactions structurelles et fonctionnelles. De plus, les souris Huntington sont bien caractérisées. Tous les vecteurs AAV et les préparations utilisées seront caractérisés *in vitro* avant leur utilisation chez l'animal. Les animaux utilisés dans le cadre de ce projet sont nés et élevés en captivité dans des élevages agréés.

Réduction : Le nombre d'animaux utilisés est optimisé pour obtenir des résultats statistiques. Leur nombre (171) a été restreint au minimum indispensable de façon à obtenir des données nécessaires pour valider l'efficacité d'une stratégie thérapeutique innovante qui peut être considérée comme cible dans plusieurs maladies neurodégénératives. En effet, des travaux précédents ont permis d'établir les doses de vecteur à injecter et les temps d'analyses.

Raffinement : Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. L'application de critères d'arrêts standards en élevage/utilisation, et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe certifient le bien-être des animaux. De plus, en cas d'observation de la moindre douleur, les souris recevront un traitement analgésique et anti-inflammatoire, et si cette douleur devait persister, les animaux seraient euthanasiés pour éviter toute souffrance.

15341 Les maladies neurodégénératives dont la maladie d'Alzheimer, d'Huntington, les ataxies spinocérébelleuses (SCA) et la sclérose latérale amyotrophique sont une préoccupation croissante en santé publique. Malgré d'importants efforts de recherche, il n'existe encore aucun traitement capable de combattre de façon efficace la progression de ces maladies.

Des nouvelles approches thérapeutiques sont essentielles pour progresser dans la prise en charge de patients. Parmi ces nouvelles approches thérapeutiques prometteuses se trouve la thérapie génique. Elle utilise l'ADN pour soigner ou prévenir de la maladie. Selon la pathologie, cet objectif peut être atteint en délivrant aux cellules un gène à action thérapeutique (transgène) qui surexprime la protéine déficiente dans la maladie. Ces acides nucléiques sont le plus souvent transportés dans les cellules grâce à un vecteur viral. La preuve de concept de cette stratégie dans des modèles murins pour ces maladies neurodégénératives a déjà été montrée.

L'objectif de ce projet est d'évaluer la faisabilité et l'efficacité de l'administration par thérapie génique à l'aide d'un vecteur Adéno associé (AAV) en voie intraveineuse.

Nous avons déjà validé le vecteur par injection intraveineuse chez la souris et l'étape primate non-humain (NHP) est cruciale en vue de valider la biodistribution du vecteur dans le système nerveux central et les organes périphériques avant d'envisager les étapes cliniques.

Le NHP est fondamental pour approcher les obstacles de l'administration de volumes importants de vecteur et du ciblage d'organes de taille semblables à celles de l'homme. Le choix de l'espèce est basé sur son homologie avec l'homme, au niveau des plans anatomiques et fonctionnels du Système Nerveux Central (SNC) et du point de vue immunitaire (tolérance semblable).

En vue d'une application clinique, la dose de vecteur est une considération importante. Ainsi dans ce projet, nous nous proposons d'évaluer l'intérêt de coupler une ouverture de la barrière

hématoencéphalique qui protège le système nerveux avec des ultrasons avant l'administration intraveineuse de vecteur.

3R Comme précédemment décrit, il nous est impossible de remplacer l'animal par une simulation informatique ou d'autres méthodes expérimentales car le cerveau du NHP est un organe plus complexe par rapport aux rongeurs et plus proche du cerveau humain (taille et anatomie). Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. L'application de critères d'arrêts standards en élevage/utilisation, et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe certifient le bien-être des animaux. De plus, en cas d'observation de la moindre douleur, les animaux recevront un traitement analgésique et anti-inflammatoire, et si cette douleur devait persister, les animaux seraient euthanasiés pour éviter toute souffrance.

Tous les animaux seront nés et élevés en captivité dans des élevages agréés. Le présent projet limitera le nombre d'animaux au strict minimum (10 NHH), et veillera à ce qu'ils ne souffrent ni des procédures d'administration des vecteurs AAV, ni de la présence d'AAVs dans leurs organes. Des examens cliniques journaliers et l'application de critères d'arrêt de protocole permettront de veiller au bien-être des animaux.

Les procédures chirurgicales seront effectuées par un groupe composé de biologistes/ingénieurs spécialistes de la neurochirurgie et un neurochirurgien. Cela garantira la faisabilité/qualité des gestes chirurgicaux, leur efficacité et la maîtrise de l'anesthésie et de l'analgésie. L'utilisation de méthodes non-invasives, en particulier d'imagerie *in vivo* (IRM), pour repérer les sites de pose d'électrode avant la chirurgie et pour vérifier l'ouverture de barrière est bien tolérée, et renforcera la qualité des interventions et leur efficacité.

Enfin l'administration de vecteur se fera par voie intraveineuse qui est non invasive et non douloureuse pour l'animal.

15342 Le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) est une caractéristique des cas graves du coronavirus, qui amène les patients concernés à être hospitalisés voire admis en service de réanimation. Les coronavirus sont une grande famille de virus comme le Covid-19, qui provoquent des maladies allant d'un simple rhume à des pathologies plus sévères. Les études ont montré que les symptômes décrits évoquent principalement une infection respiratoire fébrile qui guérit avec du repos. Mais certains patients, notamment des personnes fragiles, peuvent être amenés à être pris en charge dans une unité de réanimation en raison de complications d'ordre respiratoire.

Dans la pandémie dont nous sommes témoins aujourd'hui, les difficultés à soigner les patients résident dans la disponibilité des lits dans les services de réanimation et notamment le manque de matériel de réanimation dont les respirateurs artificiels. Pour palier à ce manque, notre équipe s'est penchée sur la fabrication d'un respirateur au moyen d'une imprimante 3D à bas coût et rapidement reproductible.

Afin de soigner très rapidement les patients qui arrivent massivement à l'hôpital ces derniers jours, il est nécessaire de tester sur un modèle de gros animaux reproduisant les mêmes physiopathologies que l'humain.

Le modèle animal de cochon a été ainsi choisi pour sa similitude avérée, en termes d'hémodynamique et de morphologie cardiaque, avec les processus physiologiques rencontrés en clinique. L'adaptation à l'environnement physiologique direct du cœur et des poumons nous conduit à réaliser cette étude sur un modèle animal où toutes les contraintes seront présentes (impossibilité de remplacement).

Ce projet utilisera 5 porcs adultes (poids = 50-60kg) au maximum.

Notre équipe travaille déjà sur ce modèle pour valider des stratégies thérapeutiques notamment dans les défaillances cardio-respiratoires. Notre expérience nous permet ainsi de réduire le nombre d'animaux utilisés et d'être efficace très rapidement, absolument nécessaire devant l'urgence de la situation sanitaire actuelle.

L'objectif de ce projet est de tester le nouveau respirateur 3D pour valider la robustesse et la pertinence de ce dispositif dans le maintien des paramètres hémodynamiques et respiratoires.

L'animal sera anesthésié, intubé et branché au nouveau respirateur pendant les 2 heures de l'expérimentation.

Les conditions d'hébergement des animaux (enrichissement du milieu), de soins (points limites) et surtout les méthodes utilisées (opérations sous anesthésie générale, analgésie contrôlée) qui sont des méthodes dérivées directement de la pratique clinique, assurent le bien-être de l'animal durant la phase expérimentale et permettent ainsi un raffinement de la méthodologie. Le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) est une caractéristique des cas graves du coronavirus, qui amène les patients concernés à être hospitalisés voire admis en service de réanimation. Les coronavirus sont une grande famille de virus comme le Covid-19, qui provoquent des maladies allant d'un simple rhume à des pathologies plus sévères. Les études ont montré que les symptômes décrits évoquent principalement une infection respiratoire fébrile qui guérit avec du repos. Mais certains patients, notamment des personnes fragiles, peuvent être amenés à être pris en charge dans une unité de réanimation en raison de complications d'ordre respiratoire.

Dans la pandémie dont nous sommes témoins aujourd'hui, les difficultés à soigner les patients résident dans la disponibilité des lits dans les services de réanimation et notamment le manque de matériel de réanimation dont les respirateurs artificiels. Pour palier à ce manque, notre équipe s'est penchée sur la fabrication d'un respirateur au moyen d'une imprimante 3D à bas coût et rapidement reproductible.

Afin de soigner très rapidement les patients qui arrivent massivement à l'hôpital ces derniers jours, il est nécessaire de tester sur un modèle de gros animaux reproduisant les mêmes physiopathologies que l'humain.

Le modèle animal de cochon a été ainsi choisi pour sa similitude avérée, en termes d'hémodynamique et de morphologie cardiaque, avec les processus physiologiques rencontrés en clinique. L'adaptation à l'environnement physiologique direct du cœur et des poumons nous conduit à réaliser cette étude sur un modèle animal où toutes les contraintes seront présentes (impossibilité de remplacement).

Ce projet utilisera 5 porcs adultes (poids = 50-60kg) au maximum.

Notre équipe travaille déjà sur ce modèle pour valider des stratégies thérapeutiques notamment dans les défaillances cardio-respiratoires. Notre expérience nous permet ainsi de réduire le nombre d'animaux utilisés et d'être efficace très rapidement, absolument nécessaire devant l'urgence de la situation sanitaire actuelle.

L'objectif de ce projet est de tester le nouveau respirateur 3D pour valider la robustesse et la pertinence de ce dispositif dans le maintien des paramètres hémodynamiques et respiratoires. L'animal sera anesthésié, intubé et branché au nouveau respirateur pendant les 2 heures de l'expérimentation.

Les conditions d'hébergement des animaux (enrichissement du milieu), de soins (points limites) et surtout les méthodes utilisées (opérations sous anesthésie générale, analgésie contrôlée) qui sont des méthodes dérivées directement de la pratique clinique, assurent le bien-être de l'animal durant la phase expérimentale et permettent ainsi un raffinement de la méthodologie.

15343 Le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) est une caractéristique des cas graves du coronavirus, qui amène les patients concernés à être hospitalisés voire admis en service de réanimation. Les coronavirus sont une grande famille de virus comme le Covid-19, qui provoquent des maladies allant d'un simple rhume à des pathologies plus sévères. Les études ont montré que les symptômes décrits évoquent principalement une infection respiratoire fébrile qui guérit avec du repos. Mais certains patients, notamment des personnes fragiles, peuvent être amenés à être pris en charge dans une unité de réanimation en raison de complications d'ordre respiratoire.

Dans la pandémie dont nous sommes témoins aujourd'hui, les difficultés à soigner les patients résident dans la disponibilité des lits dans les services de réanimation et notamment le manque de matériel de réanimation dont les respirateurs artificiels. Pour palier à ce manque, notre équipe s'est

penchée sur la fabrication d'un respirateur au moyen d'une imprimante 3D à bas coût et rapidement reproductible.

Afin de soigner très rapidement les patients qui arrivent massivement à l'hôpital ces derniers jours, il est nécessaire de tester sur un modèle de gros animaux reproduisant les mêmes physiopathologies que l'humain.

Le modèle animal de cochon a été ainsi choisi pour sa similitude avérée, en termes d'hémodynamique et de morphologie cardiaque, avec les processus physiologiques rencontrés en clinique. L'adaptation à l'environnement physiologique direct du cœur et des poumons nous conduit à réaliser cette étude sur un modèle animal où toutes les contraintes seront présentes (impossibilité de remplacement).

Ce projet utilisera 5 porcs adultes (poids = 50-60kg) au maximum.

Notre équipe travaille déjà sur ce modèle pour valider des stratégies thérapeutiques notamment dans les défaillances cardio-respiratoires. Notre expérience nous permet ainsi de réduire le nombre d'animaux utilisés et d'être efficace très rapidement, absolument nécessaire devant l'urgence de la situation sanitaire actuelle.

L'objectif de ce projet est de tester le nouveau respirateur 3D pour valider la robustesse et la pertinence de ce dispositif dans le maintien des paramètres hémodynamiques et respiratoires. L'animal sera anesthésié, intubé et branché au nouveau respirateur pendant les 2 heures de l'expérimentation.

Les conditions d'hébergement des animaux (enrichissement du milieu), de soins (points limites) et surtout les méthodes utilisées (opérations sous anesthésie générale, analgésie contrôlée) qui sont des méthodes dérivées directement de la pratique clinique, assurent le bien-être de l'animal durant la phase expérimentale et permettent ainsi un raffinement de la méthodologie.

15344 Les modèles d'étude *in vitro* ne permettent d'obtenir qu'un nombre limité d'informations. C'est pourquoi il est souvent nécessaire d'utiliser l'animal afin de pouvoir étudier, par exemple, le rôle d'un gène ou d'une pathologie au sein d'un organisme modèle entier.

L'objectif de ce projet est de produire de nouvelles lignées génétiquement modifiées par croisement avec des lignées déjà existantes pour répondre à de nouvelles questions scientifiques.

Notre plateforme est spécialisée dans l'élevage de modèles murins transgéniques pour des utilisateurs extérieurs à notre entité.

La production de souris génétiquement modifiées nécessite un stock important de souris mâles et femelles mais le fait de travailler en plateforme permet de réduire les différents lots de souris en mutualisant les efforts de production de rongeurs génétiquement modifiés sur un seul site. Le nombre de souris utilisé sera proportionnel au nombre de projets réalisés par an.

Nous estimons ce chiffre à 8000 souris sur une période de 5 ans.

Les nouvelles lignées sont créées en fonction de la demande d'utilisateurs qui ont eu l'accord d'un comité scientifique pour leur projet. Le chercheur aura vérifié au préalable que son modèle n'existe pas dans les bases de données existantes afin d'éviter la duplication d'un modèle murin et que la création de cette nouvelle lignée par croisement ne nécessite pas un surcoût d'animaux si ce croisement est déjà réalisé en interne.

Tout sera fait dans ce projet pour prendre en compte au mieux la règle des 3R.

- Remplacement aucun remplacement ne pourra être envisagé puisque ce projet a pour objectif la création de nouvelles lignées et l'évaluation du phénotype des animaux générés.

- Réduire pour réduire au maximum le nombre d'animaux, la production sera rationalisée par l'établissement de programmes d'élevage.

- Raffiner les homozygotes et hétérozygotes feront l'objet d'une surveillance particulière selon les recommandations de l'Union Européenne afin d'établir si ces créations de nouvelles lignées provoquent l'apparition de phénotype dommageable, et si c'est le cas, des points limites adaptés seront établis pour limiter toute souffrance chez les animaux.

Un soin particulier sera apporté à la qualité des conditions d'hébergement.

15345 L'initiation des cancers colorectaux humains est souvent liée à des mutations touchant le gène Apc. Notre programme de recherche se propose d'explorer les premières phases d'apparition des tumeurs intestinales, en utilisant un modèle de souris possédant une mutation de ce gène, ces animaux développant de manière spontanée des lésions au niveau de l'intestin grêle et du côlon. Ce modèle est en effet particulièrement relevant pour étudier l'initiation tumorale du tractus intestinal, et récapitule de manière remarquable la Polypose Adénomateuse Familiale, une maladie héréditaire humaine se caractérisant par l'apparition de nombreux polypes évoluant en cancers.

Ce projet sera mené selon les modalités du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ». (1) L'étude de l'initiation tumorale est un phénomène complexe, non reproductible *in vitro*, impliquant l'utilisation de souris transgéniques comme un modèle intégré (2) L'élevage des animaux se fera dans un milieu enrichi (maisonnette, carrés de cellulose) sous la supervision de personnels qualifiés des animaleries, et selon le suivi strict de l'évaluation de l'état des animaux (grilles d'évaluations et points limites). (3) Le nombre d'animaux requis pour ce projet a été défini selon une approche statistique rigoureuse permettant d'atteindre nos objectifs scientifiques et ainsi minimiser le nombre d'animaux à générer. Les individus des 2 sexes seront utilisés afin de réduire le nombre d'individus à produire. Nous déclarons utiliser 2 lignées transgéniques possédant cette mutation, soit un total d'animaux d'intérêt à générer estimé à 310 individus (soit 700 animaux au total), sur une durée totale de projet de 3 années.

15346 Le vieillissement est un processus complexe modulé par des facteurs environnementaux et génétiques. Chez l'Homme, des mutations dans certains gènes provoquent des syndromes de vieillissement prématuré, et de la sénescence cellulaire. Diverses voies génétiques ont été identifiées qui montrent une forte corrélation avec la longévité, à la fois chez l'Homme et dans des modèles murins.

Une avancée importante a été réalisée en 2006, avec la possibilité de reprogrammer des cellules adultes en exprimant une combinaison de facteurs pour les faire revenir à un état embryonnaire.

In vitro, le vieillissement cellulaire peut être inversée grâce à une stratégie de reprogrammation de la cellule. Il semble possible de surmonter les barrières liées à l'âge, et de ralentir le processus de vieillissement en manipulant le destin des cellules pour améliorer la régénération des tissus.

Nous travaillons sur des projets basés sur cette connaissance pour étudier l'impact de la sénescence cellulaire dans la régénération tissulaire. Pour cela, nous utilisons un modèle murin atteint d'une pathologie de vieillissement accéléré récapitulant le syndrome humain de Hutchinson-Gilford encore appelé Progéria. Cette maladie rarissime est caractérisée par un vieillissement prématuré débutant dès la période néonatale. L'espérance de vie des patients atteints de progéria est très limitée 13 ans en moyenne.

Ce modèle murin Progéria peut être croisé avec d'autres qui sont génétiquement modifiés afin de pouvoir induire une reprogrammation cellulaire transitoire *in vivo* et améliorer l'état de santé et la durée de vie ou suivre les cellules sénescents.

Ce projet contribuera ainsi à l'élaboration de stratégies visant à améliorer la régénération des tissus provenant de personnes âgées et de mieux comprendre les variations biologiques normales qui ont lieu avec l'âge. Cela pourrait créer des opportunités nouvelles pour la prévention et le traitement des maladies associées au vieillissement.

Pour cette étude nous prévoyons d'utiliser 1725 souris sur une durée de 5 ans.

Le suivi des animaux sera réalisé selon les règles en vigueur de la directive 2010/63 (surveillance quotidienne, soins et suivi, compétence et responsabilité du personnel, prise en charge de la douleur...). Les dispositions prises pour l'application de la règle des 3R sont les suivantes

- « Remplacer » les modèles animaux

Ce type d'analyse nécessite l'utilisation d'animaux puisqu'à l'heure actuelle, aucun modèle *in vitro* n'est capable de représenter la complexité de l'ensemble des mécanismes physiologiques et de métabolisme. Aussi, dans le cadre de ce projet, une étude sur l'organisme entier est nécessaire.

- « Réduire » le nombre d'animaux en expérimentation :

Afin d'optimiser au mieux l'utilisation de tous les animaux produits, nous allons réaliser nos tests à la fois sur les mâles et les femelles. Par ailleurs nous utiliserons en contrôles les animaux issus des croisements de parents transgéniques hétérozygotes.

Du fait de la variabilité liée au sexe il est nécessaire de constituer des groupes de mâles et de femelles.

- « Raffiner » la méthodologie utilisée, ce qui implique la notion de points limites (critères d'interruption, ou "endpoints")

Les procédures expérimentales étant non invasives, l'utilisation d'analgésiques ne sera pas nécessaire. Les animaux feront l'objet d'un suivi quotidien afin de prendre les mesures évitant toute souffrance éventuelle. Un délai d'acclimatation sera respecté dans les procédures nécessitant un isolement des animaux. L'ajout d'éléments d'enrichissement dans les cages sera systématiquement effectué.

Ces souris présentent un phénotype de vieillissement accéléré (espérance de vie moyenne 40 semaines pour les hétérozygotes). L'examen journalier des souris sera effectué pour détecter et renseigner dans des fiches de suivi individuelles les premiers signes comportementaux de la douleur ou d'éventuelles anomalies (isolement, absence de mobilité, perte d'appétit, hérissément des poils, dos voûté...). L'état de santé des animaux sera évalué par le test de réflexe du retournement et de la capacité d'agrippement qui constitueront un point limite entraînant la mise à mort de l'animal.

Si une perte de poids supérieur à 20% du poids maximal est observée, les souris seront mises à mort et enlevées des lots expérimentaux.

Dès les premiers signes de difficultés de déplacement ou de nutrition, de la nourriture humidifiée sera ajoutée dans les cages.

15347 Le projet contribue à préparer un essai clinique d'une nouvelle technique d'imagerie des cancers de l'homme (lymphome B agressif et carcinome mammaire). L'étude chez le chien consiste en l'injection intraveineuse d'un radiomarqueur innovant, qui par ses caractéristiques physiques peut ensuite être suivi, lors de sa diffusion intracorporelle, par imagerie SPECT ou TEP. L'essai a pour objectifs de valider les doses d'injection en lien avec une étude dosimétrique, d'évaluer le degré de diffusion dans l'organisme (par imagerie) ainsi que la toxicité du radiomarqueur administré par cette voie.

Avant de proposer la nouvelle approche en essai clinique chez l'homme, plusieurs questions d'ordre scientifique et technique se posent encore et sont incontournables concernant ce radiomarqueur. Un modèle gros animal tel que le chien est indispensable pour valider la technique, les modèles murins étant insuffisants du fait d'un problème d'échelle (volume injecté, vitesse) et ne permettant pas d'effectuer dans des conditions transposables à l'homme les études préalables d'imagerie et dosimétrie. Nous souhaitons dans cette étude valider, sur un nombre restreint d'animaux, ces aspects techniques d'administration du traitement et étudier la diffusion (biodistribution) du composé une fois injecté ainsi que valider la réalisation de ces imageries nucléaires avec ce nouveau marqueur.

Le Projet présenté ici sera réalisé sur le modèle chien, au total 18 animaux seront utilisés. La biodistribution du nouveau radiomarqueur ne peut être étudiée que par une évaluation *in vivo*. Cette approche est le seul moyen pour valider et conclure à la pertinence des études dosimétriques qui en découlent. Tout ceci implique, par là même, l'emploi des espèces cibles (chien) comme animal expérimental. Le protocole expérimental est standardisé par la transposition de ce qui se fait déjà lors des essais cliniques chez l'homme dans le domaine de la médecine nucléaire et assure une mise en place des procédures associées sans conséquence sur l'état général des animaux. La taille

des lots expérimentaux est réduite aux impératifs statistiques (18 animaux au total répartis en 3 lots de 6 animaux par lot). Les animaux seront hébergés en isolement dans une animalerie radioprotégée les 3 premiers jours du protocole puis rejoindront les locaux de leur animalerie habituelle. Durant toute leur utilisation, les animaux seront hébergés par groupes de 2 ou 3 individus. Des visites biquotidiennes par des animaliers seront réalisées, et une visite quotidienne sera assurée par un vétérinaire.

15348 Les principaux déterminants conduisant aux pathologies associées au syndrome métabolique (obésité, diabète de type 2, hypertension...) incluent une prédisposition génétique ainsi qu'une prédisposition due à l'influence des facteurs environnementaux. Des études épidémiologiques montrent que l'environnement intra-utérin et par conséquent l'alimentation de la mère pendant la gestation joue un rôle particulièrement important. En cas de malnutrition, des processus adaptatifs complexes, mis en place au niveau de la mère et de l'enfant, vont laisser une empreinte au niveau du fœtus qui va perdurer tout au long de la vie de l'individu.

Notre projet consiste à identifier les mécanismes moléculaires mis en place et responsables de l'acquisition de l'empreinte chez les descendants afin de mieux comprendre l'installation de prédispositions à certaines pathologies pendant la vie adulte, tout en recherchant des marqueurs de sous-nutrition fœtale pouvant être transposable à terme en clinique, chez l'homme.

Ainsi, nous comparerons différents modèles de malnutrition périnatale pendant la gestation et/ou la lactation présentant des phénotypes métaboliques différents.

Sur la période de 5 ans sur laquelle se déroulera le projet, plusieurs expérimentations de stress nutritionnel périnatal seront réalisées (environ 4 sur cette période de 5 ans) de façon à générer des échantillons provenant 1) de la mère gestante, 2) de la mère allaitante, 3) des descendants à différentes périodes de leur vie (1 jour, 10 jours, 1 mois, 2 mois pour les périodes de croissance et 6 mois pour la période adulte) et ce pour chacun des lots. Ainsi, il est prévu de commander environ 140 animaux par an, soit 700 animaux sur une période de 5 ans et de générer environ 1000 animaux en 5 ans qui seront intégrés aux protocoles expérimentaux.

Les études porteront sur différents tissus (tissus adipeux, cerveaux, pancréas, testicules, sang, lait...) de façon à identifier 1) les marques épigénétiques mises en place (méthylation de l'ADN) et leurs conséquences sur l'expression des gènes 2) les facteurs responsables de la mise en place de ces marques 3) les marqueurs précoces utilisables en médecine humaine. Pour chaque expérimentation, 170 souris (140 femelles et 30 mâles) seront utilisées comme parents, les pères pouvant être utilisés pour plusieurs reproduction et les femelles servant par la suite de souris d'entraînement pour la mise au point de nouvelles techniques. Les animaux générés à chaque expérimentation sont estimés au nombre de 50 mâles (utilisés pour les expériences) et 50 femelles qui seront soit réutilisées comme mères pour celles issues du lot contrôle soit euthanasiées au sevrage.

Les dispositions prises pour l'application de la règle des 3R (Remplacer Réduire Raffiner) en accord avec la réglementation européenne 2010/63/UE seront les suivantes

- « Remplacer » les modèles animaux nos questions scientifiques sont centrées sur les effets d'une sous-nutrition protéique pendant les périodes de gestation et de lactation. Aucun modèle cellulaire ne permettant de reproduire ces conditions, les expérimentations animales sont donc primordiales

- « Réduire » le nombre d'animaux en expérimentation Pour nos expérimentations, nous avons prévu un nombre d'animaux nécessaires pour répondre aux différentes questions scientifiques à la fois pour garder une puissance statistique dans le traitement de nos résultats, et pour palier l'exclusion de certains animaux au cours de l'expérimentation. Chaque fois que cela sera possible, les animaux ayant servis de mâle reproducteurs ou les femelles générés lors des expérimentations et non-inclues dans les protocoles expérimentaux seront réutilisés pour les protocoles suivants.

- « Raffiner » la méthodologie utilisée, ce qui implique la notion de points limites (critères d'interruption, ou « endpoints ») Comme décrit pour chacun de nos protocoles expérimentaux, nous allons porter une attention particulière au bien-être des animaux. Le suivi quotidien des animaux ainsi qu'un suivi régulier du poids et de la prise alimentaire permet d'identifier les signes de

souffrance (état du pelage, comportement, perte d'appétit et de poids...). Par ailleurs les animaux sont hébergés dans un environnement enrichi pour améliorer les conditions d'hébergement. La grande majorité des procédures expérimentales mis en œuvre sont non invasives (reproduction, nutrition, calorimétrie indirecte, pesée...). Toutefois, quand cela est nécessaire, toutes les mesures sont mises en place pour réduire la douleur, en particulier lors des procédures impliquant des gestes chirurgicaux (anesthésie et analgésie, utilisation de tapis chauffant pour le maintien de la température corporelle...)

La connaissance des mécanismes moléculaires impliqués dans l'établissement de l'empreinte consécutive à un stress nutritionnel périnatal est une étape importante dans la compréhension des prédispositions aux pathologies associées au syndrome métabolique pendant la vie adulte. A long terme ces données pourront être utiles pour la définition d'une politique de prévention pour ces maladies qui représentent un enjeu majeur de santé publique.

15349 La maladie d'Alzheimer (MA) étant complexe et liée au dysfonctionnement de multiples systèmes, aucun médicament idéal n'a émergé à ce jour. Les effets bénéfiques des traitements actuels ne sont que symptomatiques et limités aux stades initiaux de la maladie. Pour parvenir à une efficacité clinique, les futurs traitements devraient donc associer plusieurs médicaments dont les actions seraient orientées vers de multiples cibles impliquées dans la pathogenèse. Nous développons des agents thérapeutiques capables de se fixer simultanément à plusieurs cibles afin d'obtenir une combinaison d'effets. Ces molécules de type MTDL (Multi-Target-Directed-Ligand ou ligand multi-cibles) réduisent les interactions médicamenteuses. De plus, leurs activités multiples au sein d'une molécule unique conduisent à une synergie d'action qui permettrait une préservation de la mémoire. Cette étude a pour objectif la caractérisation préclinique de candidats médicaments dans des modèles animaux de pathologies neurodégénératives.

L'étude des déficits cognitifs et de la mémoire nécessite l'utilisation d'animaux, ceci ne pouvant se faire sur des modèles cellulaires (Remplacement). Nous utiliserons des souris 5xFAD (souris modèles de maladie d'Alzheimer qui développent des plaques séniles dans le cerveau), animaux adaptés aux études des phénomènes de mémoire.

Sur la base de nos résultats ayant démontré l'intérêt des traitements chroniques pour des études de prévention de la pathologie, nous réaliserons non seulement des administrations aiguës de molécules mais également des administrations chroniques. Pour ce projet, nous utiliserons 2070 souris pour les 5 ans du projet (414 souris/an).

Afin de pouvoir évaluer la mémoire, les animaux ne doivent pas être stressés et indissociables des animaux naïfs. Les souris seront hébergées en cages collectives contenant de l'enrichissement environnemental (Raffinement). L'état général de l'animal sera évalué régulièrement et en cas d'altération il y aura une prise en charge en fonction de critères d'évaluations et points limites.

Les tests de mémoire seront réalisés tous les mois (administrations chroniques de molécules) et en fin de procédure (traitements de 7 jours et traitements chroniques). Ce suivi longitudinal des performances de mémoire permettra de recueillir des informations multiples avec les animaux inclus dans les procédures (Réduction). Le nombre d'animaux utilisés est le nombre nécessaire et suffisant pour d'obtenir des résultats qui peuvent être interprétés statistiquement, plusieurs prélèvements et analyses se feront sur le même animal et nous utiliserons des mâles et des femelles (Réduction).

15350 L'anorexie mentale est un trouble du comportement alimentaire (TCA), pathologie complexe et multifactorielle sous la dépendance de facteurs biologiques, psychologiques et socioculturels. Son déterminisme physiopathologique inclut des aspects neurohormonaux et psychobiologiques complexes. L'anorexie mentale expose à de multiples et sévères complications somatiques, liées à la dénutrition (ostéoporose, défaillance viscérale, infertilité...), et psychiatriques (syndrome anxio-dépressif, troubles de l'humeur...). Il s'agit donc d'une pathologie potentiellement grave, avec un risque de chronicisation dans 25% des cas, une létalité de 0,5%/an et une mortalité de 5-10% à 10 ans (suicide et défaillance cardiaque), ce qui en fait la pathologie psychiatrique avec la mortalité la plus élevée. Les données récentes soulignent le rôle clé de la fonction de barrière intestinale et de

l'inflammation dans la régulation du comportement alimentaire, d'une part, et dans la régulation du métabolisme, d'autre part.

A ce jour, il n'existe aucun traitement médicamenteux efficace au cours de l'anorexie mentale. Il apparaît donc important d'évaluer au niveau préclinique l'impact de stratégies thérapeutiques nouvelles.

Ce projet aura donc pour objectif d'évaluer les effets d'interventions nutritionnelles spécifiques sur l'évolution du poids et de la composition corporelle, sur les mécanismes de régulation de la prise alimentaire, sur la fonction intestinale, et sur le comportement anxio-dépressif dans un modèle murin d'anorexie dit « ABA ou activity-based anorexia ». Ce projet devrait permettre de définir des nutriments spécifiques bénéfiques dont les effets pourront ensuite être évalués chez les patients souffrant d'anorexie mentale.

Des souris mâles C57BL/6 seront donc soumises ou non au modèle ABA, qui est associée à une diminution de la prise alimentaire et à une perte de poids. Les souris recevront ensuite ou non des nutriments spécifiques, comme des acides aminés ou des acides gras polyinsaturés de la série n-3. Des effets bénéfiques de ces nutriments ont été démontré dans d'autres situations pathologiques. Des mesures de composition corporelle par EchoIRM, des tests comportementaux non invasifs (compartiment éclairé/obscur croix surélevée) seront réalisés chez les souris vigiles. Après la mise à mort, des prélèvements seront réalisés pour analyser les différents marqueurs d'intérêt. En prenant en compte notre expérience antérieure sur ce modèle, il apparaît important d'inclure 8 animaux par groupe pour chaque paramètre étudié. De plus, les tests comportementaux pouvant impacter sur certains paramètres métaboliques, la procédure sera répétée deux fois. Ces éléments aboutissent à l'inclusion de 320 souris dans ce projet sur une période de 4 ans.

Au regard de la règle des 3R, pour limiter le nombre d'animaux, certaines approches très mécanistiques sont menées sur des modèles cellulaires comme par exemple l'étude des voies de signalisation intracellulaires régulant la fonction de barrière intestinale. Les procédures d'analyses ont été préalablement optimisées pour réduire l'effectif nécessaire par groupe. De plus, pour limiter le stress des animaux, plusieurs points seront mis en place (i) après leur arrivée dans l'animalerie, les souris resteront une semaine en période d'acclimatation avant le début de l'expérimentation; (ii) le milieu de la cage sera également enrichi de coton pour leur permettre de réaliser des nids. Pour prendre en charge la douleur, une évaluation de la souffrance sera réalisée deux fois par jour à l'aide d'une échelle validée. Lorsque la somme des scores sera supérieure à 5, les animaux recevront une injection de buprémorphine à la dose de 0.1 mg/kg. Si la douleur persiste plus de deux jours, les animaux seront euthanasiés. Lorsque la somme des scores sera supérieure à 7, les animaux seront euthanasiés. Lors des procédures expérimentales, une prise en charge de la douleur pourra également être mise en place par une injection de buprémorphine à la dose de 0.1 mg/kg si besoin. De plus, en cas de perte de poids supérieure ou égale à 20% sur 3 jours consécutifs ou en cas de non réponse à des stimuli extérieurs, les animaux seront mis à mort.

15351 Le projet a pour objectif d'étudier l'effet thérapeutique de différentes biothérapies c'est-à-dire des médicaments biologiques issus du corps humain dans le traitement de la dysfonction érectile (impuissance sexuelle) afin de comparer leur efficacité. Le cas échéant, la stratégie thérapeutique considérée comme la plus efficace pour la restauration de la fonction érectile pourra être testée pour le traitement d'autres dysfonctions de l'appareil uro-génital qui présentent des similitudes physiopathologiques telle que l'incontinence urinaire.

La dysfonction érectile affecte une grande partie de la population et altère de façon significative la qualité de vie des patients. A titre d'exemple, les études épidémiologiques ont montré que 2/3 des hommes diabétiques souffrent d'impuissance sexuelle. En post-opératoire d'une prostatectomie radicale effectuée dans un contexte de cancer de la prostate, 80% des patients présentent une dysfonction érectile nécessitant un traitement pharmacologique souvent insuffisant. Les traitements médicamenteux de référence ne permettent pas de réparer les lésions cellulaires à l'origine du trouble érectile. Par exemple, le traitement de la dysfonction érectile après prostatectomie radicale consiste en la réalisation d'injections dans le pénis de substances vasodilatatrices ou la prise de médicaments facilitateurs de l'érection (ex Viagra®). Ces médicaments doivent être pris à la

demande, c'est à dire avant chaque rapport sexuel. En cas d'échec, le traitement alternatif consiste en l'implantation d'une prothèse pénienne dans la verge et le scrotum. Néanmoins, les différentes approches thérapeutiques énumérées ci-dessus restent contraignantes et peuvent être à l'origine de complications telles que l'infection ou la défaillance mécanique de la prothèse pénienne rendant nécessaire la mise en place de nouvelles alternatives thérapeutiques.

Dans ce but, plusieurs procédés de biothérapie ont été récemment testés pour le traitement de la dysfonction érectile et l'incontinence urinaire. Les principales sources de cellules ou produits biologiques testées sont les cellules souches isolées à partir de tissu adipeux ou de moelle osseuse, le plasma riche en plaquettes dérivé du sang et plus récemment les mitochondries, organites responsables de la production d'énergie cellulaire. Des études *in vitro* ont montré que ces différents produits biologiques permettent la régénération tissulaire grâce à la sécrétion de facteurs de croissance (effet paracrine). Les études *in vitro* demeurent cependant incomplètes et ne peuvent pas remplacer l'étude chez l'animal car ne pouvant pas reproduire toutes les interactions cellulaires et tissulaires d'un organisme.

Cette étude sera réalisée avec des souris mâle immunodéficientes afin de tester des produits d'origine humaine sans réaction de rejet. Elle aura pour objectifs 1/ de développer un modèle de cryolésion (lésion par le froid extrême) entraînant une dysfonction pénienne chez la souris mâle immunodéficiente nude; 2 / à partir de ce modèle murin de dysfonction érectile, quantifier l'effet paracrine de 4 produits de biothérapie et 3/ de comparer l'efficacité thérapeutique de ces biothérapies. Cette étude servira de référence pour déterminer l'approche thérapeutique la plus efficace pour la dysfonction érectile.

La cryolésion du pénis et les injections des biothérapies seront réalisées sous anesthésie gazeuse et sous analgésie pré et post-opératoire (période de 3 jours). Afin de favoriser leur confort et leur récupération post-opératoire, les animaux seront hébergés par groupe de 3 par cage et seront suivis quotidiennement tout au long de l'expérimentation pour déceler toute manifestation de douleur ou de dégradation de leur état de santé qui pourrait nécessiter une analgésie supplémentaire ou une mise à mort compassionnelle.

Les souris seront analysées à trois temps différents (J1, J7 et J30) après lésion et injection des différentes biothérapies pour (i) évaluer la régénération tissulaire par histologie et biologie moléculaire (5 souris par temps et biothérapie) et (ii) déterminer les molécules sécrétées responsables de l'effet thérapeutique (analyse protéique, 5 souris par temps et biothérapie). L'ensemble de l'étude se fera sur 162 souris mâles adultes immunodéficientes de 2 à 3 mois, le nombre minimal d'animaux nécessaire pour avoir une bonne puissance statistique de l'étude.

15352 Les maladies auto-immunes (3 à 5% de la population française) sont caractérisées par un dysfonctionnement du système immunitaire qui conduit celui-ci à déclencher une réaction inflammatoire contre les constituants normaux de l'organisme. Notre objectif est, par l'utilisation d'une famille de molécules, de contrôler les symptômes et les lésions engendrées par l'inflammation en utilisant un modèle de souris mimant les maladies inflammatoires intestinales chroniques (maladie de Crohn et rectocolite hémorragique). En outre, nous voulons comprendre les mécanismes impliqués dans le contrôle de l'inflammation par cette famille de molécules. D'après nos premiers résultats, il semblerait que celui-ci soit en lien avec l'augmentation d'un petit ARN, le miRNA-124-1. La caractérisation du rôle du miRNA-124-1 a déjà été entreprise *in vitro* et nécessite une confirmation et une caractérisation fine *in vivo* de manière à comprendre les interrelations entre les cellules du système immunitaire dans la protection contre l'inflammation que nous avons observée.

Le nombre maximum d'animaux sera de 2500 souris.

Le nombre de souris pour chaque groupe est fixé par l'expérience acquise pour le modèle souris déjà caractérisé.

Les souris seront surveillées et pesées quotidiennement de manière à détecter tout signe de souffrance et également pour identifier, dans nos conditions si les temps de traitements et seuils sont valides.

Selon les procédures, les animaux pourront subir des injections (ip, iv, sc, id) ou des administrations orales quotidiennes des molécules ou des analogues. Les points limites ont été définis dans le cadre de ces expériences et dès qu'un animal présente un de ces points limites il sera immédiatement pris en charge pour une euthanasie avec, si cela s'avère possible, les prélèvements prévus.

15353 La colibacillose est une cause majeure de mortalité et d'utilisation d'antibiotiques en production de volailles et c'est la maladie la plus fréquente chez les poulets de chair. La bactérie *Escherichia coli* (*E. coli*) est naturellement présente dans les voies digestives des animaux sous forme d'une grande diversité de souches, dont certaines (appelées APEC) sont pathogènes pour le poulet et susceptibles de provoquer des pathologies qui se manifestent en présence de certains facteurs épidémiologiques défavorables. Les APEC présents chez les reproducteurs peuvent être à l'origine de colibacillose chez le poussin. Or, il n'existe actuellement aucune méthode de prévention efficace (vaccins commerciaux peu efficaces). Notre laboratoire a développé des modèles de reproduction de la colibacillose aviaire dans une précédente saisine. Dans la présente saisine, deux souches d'*E. coli* ayant permis de reproduire la maladie seront utilisés pour fabriquer un vaccin inactivé (autovaccin), administré à des poules pondeuses reproductrices. Les œufs de ces poules seront alors incubés pour faire éclore des poussins. Les modèles de reproduction de la colibacillose développés dans la première saisine seront appliqués aux poussins de la présente saisine, afin de vérifier s'ils sont protégés par la vaccination de leur mère (transfert d'anticorps dans l'œuf puis au poussin). Cette approche d'utiliser un autovaccin chez la poule pour protéger le poussin présente un intérêt économique majeur car une poule pond plusieurs dizaines d'œufs au cours de sa période de production. Cette expérimentation permettra donc d'évaluer l'intérêt de l'utilisation d'autovaccins pour protéger les poussins de la colibacillose. Les poulets utilisés seront de souche Leghorn EOPS (exempt d'organismes pathogènes spécifiés) de notre laboratoire. Cette saisine utilisera au total 52 poules reproductrices et 120 poussins.

- Règle des 3R les animaux seront hébergés en cages (poules) ou en isolateurs (poussins) et bénéficieront d'enrichissements appropriés (plateformes et éléments de perchage). Nous n'attendons pas d'effets indésirables du vaccin administré aux poules. Les inoculations aux poussins sont susceptibles de les rendre malades. Pour détecter une éventuelle souffrance des animaux, ils seront surveillés de près (4 à 5 passages par jour en plus d'observations par caméra) pour détecter des comportements anormaux (prostration par exemple). Toutes les précautions seront donc prises pour abréger une éventuelle souffrance. L'utilisation des animaux est indispensable pour ce projet car il concerne un transfert d'immunité de la poule aux poussins et ceci n'est pas modélisable *in vitro*. Cependant, le nombre de poussins a été fixé au minimum acceptable pour atteindre les objectifs du projet, à partir d'un taux de mortalité établi dans une saisine précédente. Quant au nombre de poules, il a été fixé pour produire suffisamment d'œufs et donc de poussins.

15354 La protéine NALCN est un canal ionique qui joue un rôle majeur dans la transmission de l'influx nerveux. En particulier, des mutations de cette protéine sont à l'origine de pathologies neurodéveloppementales sévères chez l'homme. Néanmoins, la localisation et le rôle précis de ce canal ionique restent mal connus. Le but de ce projet est de caractériser le rôle physiologique du canal NALCN dans les circuits de la récompense, impliqués notamment dans les processus d'addiction, et de tester son rôle fonctionnel dans les apprentissages contrôlés par la récompense. La réalisation de ce projet nécessite l'utilisation de différentes lignées de souris transgéniques ciblant des réseaux de neurones spécifiques des différentes composantes des circuits de la récompense.

La règle des 3R sera appliquée de la façon suivante :

Réduire : Cette étude anatomo-fonctionnelle s'articulera autour de 3 objectifs qui impliqueront 3 procédures expérimentales.

Le nombre total d'animaux prévu pour cette étude est de 1320 sur une période de 5 ans. Ce nombre a été déterminé de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en gardant suffisamment pour ne pas compromettre la validité statistique des expériences qui seront menées.

Seules les expériences considérées comme absolument indispensables seront réalisées. Dans le but d'une exploitation maximale des données obtenues, plusieurs régions cérébrales seront systématiquement analysées.

Raffiner : Les animaux seront hébergés en groupe dans des environnements enrichis (nids végétaux). Afin de diminuer le stress, les souris seront manipulées quotidiennement par les expérimentateurs avant chaque procédure expérimentale. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à une grille codifiant le niveau de bien-être utilisée sur notre plateau d'expérimentation. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée si des signes de souffrance (score égal ou supérieur à 10 : détresse, souffrance, prostration, perte de poids supérieure à 15%, poil ébouriffé) sont détectés.

Remplacer : Le projet reposant sur l'établissement de liens de causalité entre l'expression du canal NALCN dans des diverses populations neurones et les apprentissages contrôlés par la récompense, il nous est impossible de remplacer l'animal vivant par des méthodes alternatives.

15355 La leucodystrophie métachromatique est une maladie neurodégénérative conduisant à une perte de myéline (isolant de la gaine nerveuse) conduisant à des symptômes très sévères chez le jeune enfant avec une dégradation très rapide dans les 6 mois suivant les premiers symptômes et un décès des patients dans les 2 ans maximum.

Il n'existe à l'heure actuelle pas de traitement pour les formes symptomatiques de la pathologie pour lesquelles nous souhaitons développer une approche.

Préalablement nous avons établi une preuve de concept de l'efficacité de la thérapie génique dans le modèle murin de la pathologie avec un vecteur adéno-associé (AAV) administré en intracérébral. Ceci a conduit à un essai clinique chez l'homme mais l'expression de la protéine (ARSA) n'est pas suffisante. C'est pourquoi aujourd'hui nous souhaitons évaluer de nouveaux vecteurs qui passent la barrière hématoencéphalique après administration intraveineuse et devraient permettre une expression de la protéine dans l'ensemble du système nerveux central et périphérique. Une première étape a lieu chez la souris pour valider le tropisme, cependant dans le but de développer un essai clinique chez les enfants atteints de forme infantile, nous souhaitons d'ores et déjà évaluer la biodistribution et l'expression de ce vecteur.

Remplacement : Pour le réaliser, nous souhaitons utiliser un modèle animal (souris), car aucun modèle *in vitro* ou de culture cellulaire ne permet aujourd'hui d'étudier les symptômes de cette maladie mais aussi les marqueurs moléculaires et cellulaires. En vue d'un essai chez l'Homme l'étape chez le gros animal est indispensable.

Réduction : Enfin, le nombre d'animaux utilisés est optimisé pour obtenir des résultats statistiques. En effet, des travaux précédents ont permis d'établir les doses de virus à injecter, les temps d'analyses. De plus, un maximum d'analyses sera réalisé sur les cerveaux et la moelle épinière prélevés pour éviter des doublons des procédures expérimentales. Dans ce projet nous utiliserons au maximum 6 primates.

Raffinement : En cas d'observation de la moindre douleur, les animaux recevront un traitement analgésique et anti-inflammatoire, et si cette douleur devait persister, les animaux seraient euthanasiés pour éviter toute souffrance.

Nos études sur le primate font suite à une preuve de concept *in vivo* chez la souris et avec un nombre limité d'animaux l'étape translationnel dans un organisme plus grand étant indispensable. Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. L'application de critères d'arrêts standards en élevage et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe permettent de garantir le bien-être des animaux.

15356 Les douleurs chroniques touchent 10% de la population mondiale, mais l'absence de traitement efficace entraîne à terme le développement de comorbidités (dépression, troubles du sommeil, addiction aux opioïdes...) qui renforcent la marginalisation et la diminution drastique de la qualité de vie des patients. Au niveau cellulaire, il a été montré que cet état s'accompagne très précocement d'une activation du système immunitaire dans la moelle épinière et de la synthèse

d'une nouvelle protéine dans ces cellules. Ce projet vise à étudier précisément le rôle de cette protéine dans le développement de la douleur chronique chez la souris et à déterminer si l'absence de son gène (et donc de la protéine) enlève cette douleur. Des études ayant fait l'hypothèse que cette protéine aurait un rôle différent entre les mâles et les femelles, nous étudierons le rôle de cette protéine chez les deux genres.

Une analyse de l'activation du système immunitaire sera également effectuée.

Pour la réduction du nombre d'animaux, les mêmes animaux seront utilisés pour l'analyse comportementale et biochimiques. Le raffinement sera effectué en enrichissant le milieu des cages (carré de cellulose), en limitant au maximum l'angoisse des animaux (regroupement par cage) et en les observant quotidiennement. Une grille d'évaluation de l'angoisse et de la souffrance sera associée aux points limites qui ont été définis (perte de poids, vocalisations, saignements). S'agissant d'un projet nécessitant la mesure de comportement, il n'est pas possible de remplacer l'utilisation des animaux. Le besoin en animaux s'évalue à 420 sur 3 ans.

15357 Le rôle du cœur est de faire circuler le sang dans l'organisme. Lors d'un arrêt cardiaque, le sang ne circule plus. Tous les organes (en priorité le cerveau) sont privés de nutriments et d'oxygène et une mort cellulaire survient rapidement.

L'arrêt cardiaque touche en Europe près de 700 000 patients par an et s'associe à une mortalité de 90%. En France, la maladie cardiovasculaire reste la première cause de mortalité chez les femmes et la seconde chez les hommes.

Quand l'arrêt cardiaque est réfractaire (durée >30 minutes malgré des manoeuvres de réanimation supervisées par un professionnel médical), la mise en place d'un « cœur artificiel externe », une pompe veino-artérielle appelée ECMO (Extra corporeal membrane oxygenation) permet de refaire circuler le sang en aspirant le sang veineux dans la veine fémorale et en le réinjectant dans l'artère fémorale le sang circule à nouveau dans l'organisme et les cellules reçoivent oxygène et nutriments. Au décours de la mise en place de l'ECMO, le sang circule à nouveau mais l'inflammation de l'organisme est telle qu'il existe une dilatation des vaisseaux artériels et une fuite d'eau du sang vers les tissus qui s'accompagne d'un état d'hypovolémie intense (diminution du volume sanguin). Tout cela conduit à une chute de la pression artérielle, en dessous de la pression nécessaire pour perfuser les organes et à des désamorçages de la pompe (le patient est tellement hypovolémique qu'il n'y a plus assez de volume sanguin veineux à aspirer pour assurer un débit sanguin dans la pompe artificielle compatible avec la vie).

Pour éviter cela, le patient bénéficie d'une réanimation standard avec un traitement composé de « remplissages » (on injecte au patient plusieurs litres de sérum physiologique pour corriger l'hypovolémie) et un traitement par vasopresseur (càd NORADRENALINE, un médicament vasoconstricteur qui va corriger la dilatation des vaisseaux).

Cependant on sait que ces remplissages ne sont pas démunis de toxicité et sont même associés à une surmortalité si le volume total utilisé devient trop important. Certains traitements comme l'albumine permettent d'augmenter le volume sanguin en réalisant des remplissages de plus petits volumes. D'autre part, l'utilisation de fortes doses de noradrénaline ainsi que l'absence de réponse favorable peuvent être observées et le clinicien peut être amené à utiliser d'autres thérapeutiques. L'utilisation de vasoconstricteurs différents, tel que le bleu de méthylène, dans le traitement de ces états de vasodilatation généralisée pourrait être proposé devant la résistance aux catécholamines.

A notre connaissance, il n'existe pas d'étude clinique ou animale robuste étudiant l'intérêt de l'albumine ou du bleu de méthylène dans les états de choc rencontrés après réanimation d'un arrêt cardiaque réfractaire traité par assistance circulatoire extra-corporelle.

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'efficacité de nouvelles thérapeutiques dans ce modèle de choc post arrêt cardiaque sous assistance circulatoire extra-corporelle.

Le projet comprend deux études distinctes

Etude 1 Evaluer l'efficacité de l'albumine sur le remplissage et la fuite d'eau des vaisseaux

Etude 2 Evaluer l'efficacité du bleu de méthylène dans le traitement de la vasodilatation.

Afin de réduire au maximum le nombre de cochons nécessaire à ces deux études, il a été décidé de constituer un groupe contrôle commun. Le projet sera donc constitué de trois groupes de 10 cochons

1-un groupe soumis à une réanimation standard seule (remplissages au sérum physiologique + noradrénaline),

2-un groupe soumis à une réanimation standard + Albumine,

3-un groupe soumis à une réanimation standard + Bleu de méthylène.

Ce projet permettra de réaliser 2 études une première comparant « Réanimation standard + albumine » et

« Réanimation standard seule » et une seconde comparant « Réanimation standard + Bleu de méthylène » et « Réanimation standard seule ».

Le modèle animal de cochon est utilisé pour sa similitude avérée, en termes d'hémodynamique et de morphologie cardiaque, avec les processus physiologiques rencontrés en clinique. L'adaptation à l'environnement physiologique direct du cœur nous conduit à réaliser cette étude sur un modèle animal où toutes les contraintes seront présentes (impossibilité de remplacement).

Ce projet utilisera 30 porcs adultes (poids = 50-60kg) permettant ainsi une étude statistiquement exploitable. Afin de réduire au maximum le nombre de cochons nécessaire à cette étude, nous avons décidé d'associer les 2 projets différents (intérêt de l'albumine et intérêt du bleu de méthylène) et de constituer un seul et même schéma expérimental avec un seul groupe contrôle commun permettant donc ainsi de réduire le nombre de cochons. De plus, ce modèle est déjà en place et maîtrisé dans notre structure. L'arrêt cardiaque sera provoqué par une ligature coronaire puis après 30 minutes (mise en place du choc post-réfractaire), une assistance circulatoire (ACE ou ECMO) sera mise en place et 3 thérapeutiques seront testées selon le groupe tiré au sort Bleu de méthylène ou Albumine ou Réanimation standard seule afin de déterminer leur implication et leur bénéfice. L'ensemble du protocole sera réalisé sous anesthésie générale avec un niveau de sédation comparable à celui utilisé en clinique chirurgicale chez l'homme.

Les conditions d'hébergement des animaux (enrichissement du milieu), de soins (points limites) et surtout les méthodes utilisées (opérations sous anesthésie générale, analgésie contrôlée) qui sont des méthodes dérivées directement de la pratique clinique, assurent le bien-être de l'animal durant la phase expérimentale et permettent ainsi un raffinement de la méthodologie.

15358 De nombreuses études concernant les facteurs influents la santé a montré un lien entre une inflammation maternelle (infection bactérienne ou virale) pendant la grossesse et le développement de troubles neurologiques chez le fœtus. L'inflammation maternelle modérée présente un facteur de risque pour l'apparition de troubles de l'apprentissage (la cognition) et de comportement (hyperactivité) observés chez l'enfant et l'adulte.

D'autres études montrent également que l'alimentation maternelle pendant la grossesse représente un facteur de risque pour le cerveau en développement du fœtus, notamment en situation de déséquilibre alimentaire telle qu'une carence en omega-3. Les omega-3 sont des nutriments essentiels pour le cerveau en développement, ils présentent des propriétés anti-inflammatoires, jouant alors le rôle de protecteur du cerveau. Cependant, les apports en omega-3 restent insuffisants dans l'alimentation occidentale, privilégiant un état inflammatoire néfaste pour le cerveau en développement.

L'axe intestin-cerveau mis en relation par la flore intestinale est connu comme un acteur potentiel du fonctionnement du système nerveux central. Particulièrement quand un déséquilibre de la flore intestinale est provoqué par à une carence alimentaire, ou une inflammation.

Notre objectif est donc d'étudier les anomalies neurologiques engendrées par les effets combinés d'une inflammation (infection bactérienne ou virale) et d'une carence en omega-3 de la mère sur sa descendance.

Nous utiliserons un modèle de souris qui consistera d'une part à reproduire l'inflammation par l'administration de lipopolysaccharide (LPS) une molécule capable de stimuler le système

immunitaire permettant ainsi de mimer une infection par libération de substances inflammatoires. L'administration de cette molécule se fait par une injection en intra-péritonéale chez la femelle gestante à la fin de la gestation. Cette injection est réalisée par un geste maîtrisé de contention et ne nécessite pas d'anesthésie. Et d'autre part, ce modèle consistera à reproduire une carence en oméga-3 chez la descendance, les animaux (femelles gestantes puis la descendance) seront alimentés en croquettes déficientes ou pas en oméga-3. Cette carence débutera dès le début de la gestation et se terminera à la mise à mort de la descendance.

La durée du projet sera de 5 ans et nécessite 410 animaux au total. Pour toutes les procédures expérimentales, nous avons calculé le nombre minimal de souris requis 10 mâles féconderont 128 femelles qui donneront naissance à 272 souriceaux mâles (total = 410) permettant d'aboutir à des données analysables par méthodes statistiques classiques.

A l'issue du projet, les géniteurs seront euthanasiés (10 mâles et 128 femelles). La descendance femelle issue des différentes portées permettra d'égaliser les portées et sera euthanasiée au sevrage.

La descendance mâle de l'étude sera euthanasiée (272) à 21 jours et 3 mois, les cerveaux et la flore intestinale seront prélevés.

Nous ne pouvons remplacer les animaux par d'autres techniques du fait du caractère « intégré » de la question scientifique posée (interaction corps-cerveau).

La règle des 3R sera respectée réduire, raffiner, remplacer

Réduire : Le nombre d'animaux prévu est amené à 272 descendants mâles afin d'obtenir des données analysables satisfaisantes pour répondre aux questions scientifiques de notre projet tests de comportement, analyse du tissu cérébral (immunohistochimie) et flore intestinale (perméabilité membranaire).

Afin d'optimiser le modèle, plusieurs points impactés seront étudiés la flore intestinale, les marqueurs de l'inflammation, les cellules du système nerveux, le comportement cognitif.

Le faible taux de mortalité de la descendance dans ce modèle (5%) permettra de limiter le nombre d'animaux par groupe nécessaire à cette étude.

Raffiner : Les femelles gestantes seront hébergées avec un enrichissement avec du papier absorbant doux pour la création du nid comme dans leur milieu naturel.

Les femelles gestantes seront observées tout au long du protocole afin d'observer l'effet du régime. Elles seront pesées pendant la gestation. Leur comportement nourricier après la mise bas sera observé.

Au sevrage, la descendance mâle sera hébergée en groupe, en milieu enrichi pour minimiser leur stress.

Remplacer : Il n'existe actuellement aucune méthode alternative permettant d'étudier l'effet sur la descendance d'une alimentation pauvre en oméga-3 et une inflammation pendant la gestation, de plus les mécanismes impliqués mettent en jeu l'interaction de plusieurs types cellulaires au cours du développement ainsi que l'interaction intestin-cerveau qui sont impossibles à reproduire *in vitro*.

Par ailleurs, l'étude de l'impact d'une alimentation pauvre en oméga-3 et une inflammation ne peuvent être envisagées qu'*in vivo* en particulier sur le plan comportemental.

15359 De nombreux travaux scientifiques ont d'ores et déjà démontré les bénéfices du pâturage sur la qualité organoleptique et nutritionnelle des fromages. Les fromages sont plus fondants, leur goût est plus corsé et la composition de la matière grasse est améliorée... Le pâturage sur des prairies naturelles, comparativement à des prairies semées, présente des atouts supplémentaires. Lorsque l'herbe est conservée, les effets bénéfiques de l'herbe sont atténués et variables selon son mode de conservation. Ces effets ont été largement mis en évidence mais ils sont encore mal compris dans l'ensemble. Ils sont liés en partie à la modification de la composition biochimique du lait mais le rôle potentiel des microorganismes du lait cru semble important également. Les nouveaux outils de la métagénomique dont nous disposons nous permettent de mieux comprendre les mécanismes à l'œuvre. Nous mesurons mieux comment les types d'alimentation (la nature des fourrages, le

mode de conservation) contribuent à orienter la composition biochimique du lait cru et de ses écosystèmes microbiens, et comment ils façonnent, au final, les caractéristiques du fromage affiné. Les premiers résultats dont nous disposons semblent indiquer que le fonctionnement de l'écosystème microbien du rumen joue un rôle majeur.

Ce projet propose d'étudier l'effet de la diversité botanique des prairies et du mode de conservation de l'herbe (pâturage, affouragement en vert, foin, ensilage) sur le microbiote du rumen qui, de manière indirecte, peut modifier celui du lait et du fromage. Nous faisons l'hypothèse que plus la prairie sera riche en espèces végétales, notamment en dicotylédones, et plus le rumen présentera une abondance et une diversité élevée d'espèces microbiennes (bactéries, archaées, champignons et protozoaires), favorables à son fonctionnement et en conséquence ayant potentiellement un impact positif sur l'état sanitaire et le bien-être des animaux et sur la qualité sanitaire et nutritionnelle des laits et des fromages. Nous faisons également l'hypothèse que le mode de conservation de l'herbe peut modifier de manière notable le microbiote du fourrage et ainsi avoir des répercussions importantes sur celui du rumen qui lui-même peut avoir des effets en cascade sur les communautés microbiennes, des fèces, de la surface des trayons, du lait et des fromages.

S'il est impossible de remplacer l'animal dans cet essai, l'ensemble du projet a été réfléchi de manière à respecter au mieux le principe des 3R. En raison de la grande variabilité individuelle qui existe au niveau de l'écosystème microbien du rumen, nous prévoyons d'utiliser 4 lots de 12 vaches laitières pendant une période de 3 mois. Ce nombre d'animaux est nécessaire et suffisant pour permettre l'obtention de résultats statistiquement valables. Des premiers prélèvements de jus de rumen, de fèces et de sang seront réalisés en mai lorsque tous les animaux reçoivent une ration hivernale à base de foin. Les données issues de ces prélèvements seront utilisées comme covariables pour le traitement statistique des résultats. Les mêmes prélèvements seront répétés fin juin sur 2 lots vaches conduites au pâturage sur une prairie permanente très diversifiée (12 vaches) ou sur une prairie temporaire (12 vaches) pour étudier l'effet de la composition botanique des prairies. Ces prélèvements seront répétés fin juillet sur 4 lots de 12 vaches recevant de l'herbe issue d'une même parcelle utilisée sous forme de foin, d'ensilage, de pâturage ou d'herbe verte coupée et affouragées en stabulation. Les prélèvements de fin juillet permettront de tester l'effet du mode de conservation d'un même fourrage. Des périodes de 4 semaines minimum entre les prélèvements sont nécessaires pour que les écosystèmes microbiens des différents milieux prélevés se stabilisent suite aux changements d'alimentation. La procédure de prélèvement utilisée permet un raffinement optimal des conditions d'expérimentation pour l'animal. Ces prélèvements permettront de mettre en relation les écosystèmes microbiens du rumen avec ceux des aliments, des fèces, des zones de couchage, de la surface de la mamelle, du lait et du fromage.

15360 Le cancer est l'une des principales causes de mortalité dans le monde. Le cancer du poumon est l'un des cancers les plus répandus (en 4ème position en France). La recherche se doit d'être accrue pour pouvoir trouver des traitements efficaces.

La radiothérapie est le deuxième traitement le plus utilisé pour combattre le cancer après la chirurgie. De récentes recherches ont démontré que la combinaison de la radiothérapie avec l'immunothérapie permet de faire régresser la maladie. Par ailleurs, de nouvelles cibles thérapeutiques ont vu le jour pour traiter les cancers solides ainsi que les cancers hématologiques en se tournant vers l'apoptose la mort cellulaire programmée.

La dérégulation de l'apoptose fait partie des premières causes de développement et de progression du cancer. Elle joue un rôle majeur dans la résistance aux chimiothérapies, les thérapies ciblées ainsi que la radiothérapie. Les cellules tumorales résistent à l'apoptose en produisant un nombre important de protéines qui vont bloquer les voies pro-apoptotique.

Au sein de la cellule cancéreuse, il y a un blocage de certaines protéines impliquées dans l'induction de l'apoptose par des inhibiteurs. Une nouvelle approche thérapeutique a vu le jour avec des molécules qui miment l'activité de ces protéines pour restimuler la mort cellulaire de ces cellules cancéreuses.

Ces molécules sont des antagonistes des inhibiteurs de l'apoptose. De récentes recherches ont montré une synergie entre l'antagoniste et des anticorps qui permettent une meilleure activation du système immunitaire et qui se dirigent contre la tumeur. Mais pour le moment, aucune donnée n'a montré d'efficacité de traitement avec la radiothérapie. Etudier les effets que peuvent avoir la triple combinaison est une nouvelle piste de traitement pour les cancers du poumon.

Afin de déterminer l'efficacité de traitement de cette triple combinaison, seul un modèle *in vivo* pourra nous apporter les informations nécessaires. En effet, le type d'interaction évalué est complexe et inclut le rôle de la radiothérapie sur les différents tissus ciblés : du système immunitaire et du microenvironnement tumoral. Il n'existe pas de modèle *in vitro* permettant une telle étude. Le projet nécessite donc d'être mené sur un organisme vivant disposant d'un système immunitaire.

Nous avons mis en place des stratégies d'expérimentation et d'observation afin de réduire au minimum la souffrance et la douleur des animaux. Les souris seront hébergées en groupe pour minimiser le stress de l'isolement. De plus, l'environnement des animaux sera enrichi en permanence par du coton ou des nids en carton afin de diminuer leur angoisse et favoriser leur bien-être. Les points limites seront strictement appliqués. Le nombre d'animaux sera adapté pour atteindre les objectifs du projet et réduire au minimum le nombre d'animaux. En effet, une analyse statistique *a priori* a été effectuée afin de calculer le nombre d'animaux nécessaires pour détecter des différences significatives tout en réduisant au minimum le nombre d'animaux, qui a été estimé au maximum à 1198 sur 4 ans.

15361 De nombreuses fonctions essentielles de l'organisme comme la croissance, le métabolisme ou encore la reproduction sont directement induites par la sécrétion d'hormones dans le sang au niveau d'une glande localisée à la base du cerveau l'hypophyse. Aujourd'hui, les nombreuses pathologies endocriniennes hypophysaires (retards de croissance, acromégalisme, infertilité, syndrome de cushing, hyper et hypothyroïdie, adénomes et tumeurs hypophysaires, ...) touchent jusqu'à 20% de la population Française et ne cessent d'augmenter avec l'évolution de notre mode de vie en contact permanent avec des perturbateurs endocriniens.

La sécrétion des hormones hypophysaires est pulsatile et cette pulsatilité est indispensable au bon fonctionnement de l'organisme. Or les protocoles médicaux actuels dans les hôpitaux français sont basés sur un taux de sécrétion ponctuel et ne prennent pas en compte ses variations journalières. De plus, la sécrétion hormonale est fonction de nombreux autres paramètres comme l'âge, le sexe ou encore d'autres facteurs comme l'alimentation, le stress ou encore le rythme journalier.

Ce projet a pour but de comprendre les mécanismes de sécrétion de différentes hormones hypophysaires et ainsi de concevoir de nouveaux tests de diagnostic, de suivi et voire de traitements, plus précis, des troubles hypophysaires chez l'Homme à partir des données obtenues chez la souris.

A ce jour, aucune étude *in vitro* n'a permis de reproduire ces mécanismes de pulsatilité endocrine. Nous proposons donc d'étudier, dans des modèles murins, la sécrétion des hormones hypophysaires chez des souris mâles et femelles, saines et présentant différentes pathologies puis de déterminer les tests d'induction de la sécrétion hormonale les plus adaptés à chaque profil d'individus. Ces protocoles pourront alors, dans une deuxième phase, être testés en clinique par nos collaborateurs médecins. Un meilleur diagnostic/traitement permettra de réduire les risques de mortalité et de morbidité résultant d'un diagnostic incorrect et d'un traitement inapproprié.

Pour répondre à ces objectifs, nous devons réaliser des expériences en imagerie intravitale chez la souris et ce sur la base de calculs statistiques nous permettant de prédire le nombre d'animaux nécessaire pour obtenir des résultats valides (calculé à 546 souris/an pour un total maximum de 2730 souris sur toute la durée du projet), sachant que tout sera mis en œuvre pour le réduire à son minimum en fonction des résultats obtenus.

Notre démarche expérimentale est basée sur l'application de la règle des 3R de la façon suivante
- Remplacement Il n'existe malheureusement aucune méthode alternative à l'expérimentation animale car cette étude physiologique est basée sur la sécrétion des hormones dans le sang au

cours du temps et durant des stimulations endocrines. Mais une fois publiée ces données pourront servir de bases à des études *in vitro* de mécanistique cellulaire et moléculaire.

- Raffinement nos approches permettent de limiter au maximum l'utilisation d'animaux conscients, une grande partie des expérimentations sera réalisée sur animal anesthésié. Pour les expérimentations réalisées sur animal vigile, nous apporterons le soin nécessaire pour garantir une qualité irréprochable des données enregistrées, notamment en réalisant l'ensemble des manipulations invasives en une seule chirurgie, et en donnant aux animaux le temps de s'acclimater aux conditions d'enregistrement. Les animaux seront notamment suivis quotidiennement et traités avec des antalgiques pour prévenir toute souffrance. Une liste de points limites spécifiques aux modèles employés a été définie et l'arrêt des procédures sera décidé en concertation avec la SBEA de l'institut.

- Réduction Un atout majeur des approches sur animal vigile envisagées ici est de permettre un suivi longitudinal sur plusieurs jours dans lequel chaque souris est son propre contrôle, permettant ainsi de réduire le nombre d'animaux utilisés.

15362 Les ciliopathies sont des maladies génétiques rares affectant les cils primaires. Dans la rétine, le cil primaire correspond au cil connecteur, reliant les segments externe et interne des photorécepteurs, où le signal lumineux est transformé en signal électrique, qui sera relayé au cerveau. Le cil connecteur a pour rôle le transport des protéines d'un compartiment vers l'autre. Des études antérieures sur la dégénérescence rétinienne ont démontré qu'un défaut de structure ou de fonction ciliaire, causait un dysfonctionnement dans la machinerie de transport conduisant à une accumulation des protéines et à un stress pour la cellule. En réponse à ce stress, des voies de signalisation sont alors activées pour réduire la quantité de protéines. Lorsque cette accumulation ne peut être enrayée, l'activation de ces mêmes voies conduit à la mort des photorécepteurs et au phénotype de rétinopathie pigmentaire.

Parmi les ciliopathies se trouve le syndrome de Bardet-Biedl (BBS) qui a été largement étudié, à la fois chez des modèles murins et chez des patients. En se basant sur ces connaissances scientifiques, une approche pharmacologique a été développée et testée sur un modèle murin de ciliopathie, mimant le syndrome Bardet-Biedl. Il a ainsi été prouvé qu'il était possible de réduire la mort cellulaire dans ce modèle en combinant deux médicaments déjà commercialisés l'acide valproïque (VPA) et le guanabenz (GBZ). A l'heure actuelle, pour le traitement des maladies de la rétine, la méthode la plus répandue pour l'administration de médicament est l'injection intravitréenne, mais cela reste une méthode très invasive, d'autant que la cible première du traitement concerne les jeunes enfants.

L'objectif du projet est donc de développer un traitement non invasif, sans aiguille, à base de nanoparticules magnétiques, couplés aux médicaments cités ci-dessus. Le traitement serait composé de deux solutions de nanoparticules qui seront utilisées comme collyre à déposer à la surface de l'œil, un aimant disposé à l'arrière de la tête de la souris permettant de diriger leur flux. La petite taille des nanoparticules (NP) et leur guidage avec des aimants devraient permettre au traitement d'atteindre la rétine en quantité suffisante pour avoir un effet positif.

Pour le projet, des modèles murins de ciliopathie seront utilisés, notamment les modèles Bbs1, Bbs10 et Bbs12. Ces modèles ont déjà été étudiés dans la littérature et leur progression de la maladie est similaire pour les trois modèles animaux mais aussi à celle de la maladie humaine. Les études *in vivo* nous permettront de tester le traitement et d'obtenir les informations nécessaires concernant la répartition du traitement au sein de la rétine et son efficacité, mais également de constater si le traitement peut engendrer des effets négatifs indésirables.

Toutes nos expériences suivent les principes du 3 R remplacement, réduction, raffinement. Pour la première approche, nous allons remplacer le test *in vivo* en utilisant des cultures cellulaires reproduisant une partie de la rétine pour évaluer d'éventuels effets secondaires négatifs de notre traitement. Cela réduira également le nombre d'animaux que nous devrons utiliser pour obtenir des résultats statistiquement significatifs sans affecter les objectifs scientifiques du projet. Le raffinement consistera au bien-être des souris pendant la durée du projet. Les critères d'évaluation

des animaux vigiles seront le poids, l'aspect général de la souris, son comportement dans la cage ainsi qu'avec ses congénères (au maximum 4 par cages). Toutes les expériences seront réalisées sous anesthésie, et des points limites, établis pour veiller au bien-être animal et épargner toute souffrance, seront mis en place.

Un total de 543 souris sera nécessaire pour mener à bien ce projet. Ce nombre est le plus petit nous permettant de tester différentes conditions et d'obtenir des résultats statistiques significatifs.

Le projet donnera des données constructives pour un traitement thérapeutique, mais mettra surtout l'accent sur un mode d'administration innovant et non invasif susceptible de toucher un jeune public.

15363 Le but de ce projet est de tester puis de valider un nouveau format d'anticorps thérapeutique bispécifique ciblant à la fois le récepteur de la transferrine TfR1 (récepteur exprimé ubiquitairement à un niveau faible par de nombreuses cellules et surexprimé par de nombreuses tumeurs) et des molécules du micro-environnement soluble tumoral (par exemple l'IL6) par

1) une étude pharmacocinétique pour prouver la supériorité de capacité d'élimination d'un facteur soluble (systémique ou tumoral) par rapport à celle d'un anticorps monospécifique.

2) une étude d'efficacité thérapeutique sur différents modèles de cancer, comparée à l'efficacité d'une monothérapie ou d'une combinaison des 2 anticorps parentaux, et à un traitement chimiothérapeutique de référence.

Il n'existe pas de méthodes alternatives à ces expériences de preuve de concept *in vivo*, les modèles précliniques sur souris immunodéprimées sont impératifs afin de valider l'efficacité de nos anticorps, afin d'envisager la translation vers la recherche clinique.

La règle des trois R sera respectée en réalisant des tests *in vitro* qui nous permettront de sélectionner les traitements les plus pertinents à tester chez les animaux et de réduire le nombre de souris. Nous travaillons aussi avec une unité de biométrie, afin d'analyser statistiquement le nombre minimum d'animaux nécessaire et pas plus. Les animaux utilisés feront l'objet d'une surveillance régulière et leur milieu sera enrichi à l'aide de litière mélangée à des copeaux, ainsi que de briques de peuplier.

Le volume tumoral sera mesuré 2 à 3 fois par semaine, les souris seront également pesées à ces moments là. Les points limites qui seront respectés sont

-volume tumoral supérieur à 1.5cm³

-une perte de poids supérieure à 20% du poids initial

-atteinte de l'état général de la souris (diarrhée), comportement anormal (isolement par rapport aux autres animaux, respiration laborieuse) signe de douleur et/ou de nécrose de la tumeur

Pour l'ensemble de ce projet, nous avons prévu un nombre de 738 souris sur une durée de 4 ans.

15364 Les infections du système digestif par des parasites représentent un problème de santé mondial. À ce titre, la compréhension des mécanismes régissant l'immunité des muqueuses est une question majeure que nous nous proposons d'explorer dans ce projet. Notre équipe vient de mettre en évidence que certaines cellules épithéliales de l'intestin, les cellules tuft, sont impliquées dans la réponse immunitaire mise en jeu lors d'infection parasitaire et d'allergie (aussi appelée réponse de type 2). Nous souhaitons comprendre quelles peuvent être les fonctions de ces cellules en utilisant un modèle d'infection expérimentale de souris avec le parasite *Heligmosomoides polygyrus*, un parasite naturel des rongeurs. Ce projet sera mené selon les modalités du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R »).

(1) L'étude de la réponse immunitaire anti parasitaire est un phénomène complexe, impliquant de nombreux types cellulaires, non reproductible *in vitro*, rendant impossible le remplacement des animaux. Nous utiliserons des souris transgéniques de tester nos hypothèses de travail dans un modèle intégré. Nous utiliserons les souris des deux sexes, afin de minimiser le nombre d'animaux à produire (2) L'élevage des animaux se fera dans un milieu enrichi (maisonnette, carrés de cellulose) sous la supervision de personnels qualifiés des animaleries, et selon un suivi strict des points limites. Des substances anesthésiantes seront utilisées lors des phases expérimentales. (3)

Le nombre d'animaux requis pour ce projet a été défini selon une approche statistique rigoureuse permettant d'atteindre nos objectifs scientifiques et ainsi minimiser le nombre d'animaux à utiliser. Nous utiliserons 5 lignées transgéniques, soit un total d'animaux estimé à 220 individus, sur une durée totale de projet de 2 années

15365 La colite ulcéreuse (CU) fait partie des maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI). Elle se caractérise par des zones d'inflammation de la muqueuse du côlon et du rectum et évolue par poussées entrecoupées de périodes de rémissions. La prévalence des maladies intestinales est d'environ 1 pour 1000 personnes en Europe et environ 5% des patients présentent un risque accru de développer un cancer du côlon ainsi que d'autres troubles immunitaires chroniques, tels que le psoriasis ou la spondylarthrite ankylosante. Les stratégies thérapeutiques actuelles ont pour premiers objectifs le contrôle des poussées, la prévention des rechutes et le maintien d'une qualité de vie optimale pour chaque malade. Cependant, aucune de ces stratégies n'est curative ou exempte d'effets secondaires. Ainsi, de nouvelles connaissances sur les mécanismes à l'origine pourraient avoir une influence importante sur les futures stratégies thérapeutiques, en particulier en cas de rémission de la maladie.

Ce projet de recherche a pour objectif global d'améliorer la connaissance des mécanismes moléculaires impliqués dans le développement de la colite ulcéreuse. Pour cette étude, l'utilisation de modèles précliniques de MICI (développement d'une inflammation aiguë ou chronique) sont nécessaires à la compréhension de ces maladies et au développement de nouvelles thérapeutiques. Ce projet nécessite 288 souris sur 5 ans, soit environ 58 souris/an; le nombre d'animaux pour chaque traitement ayant été déterminé afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en nous permettant de réaliser des études statistiques. Dans le souci de respecter la règle de 3R, s'il n'y a aucune ambiguïté sur les résultats, les répétitions inutiles seront évitées afin que le nombre total de souris utilisées dans ce projet soit inférieur au nombre total annoncé. Enfin, grâce à l'enrichissement du milieu mis en place (briques de peuplier ou des carrés de cellulose) et en choisissant des points limites suffisamment précoces (amaigrissement, sang dans les fèces), nous pourrions obtenir des résultats scientifiquement valides tout en réduisant au maximum la durée de l'expérimentation et l'éventuel inconfort de l'animal.

15366 Dans le cadre de la recherche de nouveaux candidats médicaments pour traiter les maladies cardiovasculaires, l'évaluation des paramètres fonctionnels et hémodynamiques sont d'un intérêt majeur.

Plusieurs techniques expérimentales permettent la mesure des paramètres hémodynamiques (pression artérielle, fréquence cardiaque ...). Néanmoins la plupart de ces techniques sont invasives et nécessitent l'euthanasie de l'animal suite à la mesure des paramètres d'intérêts. La disponibilité d'une technologie telle que la télémétrie a permis d'effectuer une grande avancée à ce niveau. En effet, il s'agit d'une technique qui permet de récolter en temps réel et à distance des données biologiques de l'animal (pression artérielle, fréquence cardiaque, électrocardiogramme, température corporelle, activité locomotrice,) et ceci grâce à l'implantation d'un capteur de pression au niveau de l'artère abdominale. L'avantage de cette technique réside dans sa capacité à fournir des données quantitatives et en temps réel, mais surtout des données qualitatives en absence de facteurs de stress comme la manipulation, la contention ou l'anesthésie de l'animal. De plus les systèmes de télémétrie sont dotés d'une grande autonomie permettant d'enregistrer en continu les paramètres hémodynamiques pendant environ 6 mois.

Le but de ce projet consiste à utiliser la télémétrie chez le rat (différentes souches de rat) pour évaluer les effets d'un nouveau candidat médicament, sa cinétique d'action, ainsi que son niveau de tolérance par l'animal. Deux types d'études seront mises en place

- Des études aiguës qui visent à évaluer les effets d'un traitement administré en une seule dose ou en doses répétées sur une courte durée d'environ 7 jours.
- Des études chroniques qui visent à évaluer les effets d'un traitement administré chroniquement sur une longue durée d'environ 6 mois.

Cette technologie est aujourd'hui hautement maîtrisée dans nos laboratoires, tant sur le plan expérimental par l'implantation d'un capteur de télémétrie au niveau de l'aorte abdominale que sur le plan analytique (analyse et interprétation des données de pression artérielle, d'activité locomotrice, de température, de fréquence cardiaque,).

L'état de santé de l'ensemble des animaux de ce projet sera surveillé de façon régulière par les expérimentateurs (réalisateurs et concepteurs) et le personnel de zootechnie qui assure le soin aux animaux par la structure de bien-être animal (SBEA),

Les données de signes physiologiques, cliniques et comportementales sont régulièrement recueillies durant les phases d'hébergement afin d'enrichir les connaissances sur les phénotypes de chacune des lignées hébergées. L'objectif de cette veille, au-delà d'une meilleure connaissance des souches hébergées, est de limiter au maximum l'inconfort pour les animaux, en définissant les conditions optimales d'hébergement et d'utilisation adaptées aux besoins scientifiques.

Les animaux, pour des raisons d'acquisition du signal, sont hébergés en cage individuelle mais un enrichissement du milieu avec des bâtonnets et des crinklets sont mis à disposition des animaux.

L'implantation des capteurs de télémétrie est réalisée sous une couverture anesthésique (Isoflurane, induction 5% et maintien 2-2.5%) et analgésique (Buprecare 50 µg/kg en SC + lidocaïne 0.5% au niveau local) adéquate afin de limiter tout signe de douleur liée à l'acte chirurgical. Les animaux sont sous surveillance et récupération post opératoire 15 jours avant le début du traitement.

Le suivi longitudinal nous permet de diminuer le nombre d'animaux puisque chaque animal est son propre contrôle et nous pouvons aussi randomiser les animaux dans les différents groupes en fonction de leurs paramètres hémodynamiques avant traitement, ce qui nous permet de commencer les études avec des groupes homogènes sur nos paramètres d'intérêts.

L'évaluation de l'efficacité des candidats médicaments dans ce contexte nous permet non seulement de quantifier ses effets hémodynamiques tel que ses effets sur la pression artérielle, mais également d'évaluer ses effets sur des paramètres vitaux plus généraux reflétant le bien-être animal comme la température corporelle ou encore l'activité locomotrice.

Cette technique de télémétrie peut aussi être combinée avec des techniques d'imagerie cardiaque comme l'échographie nous permettant d'avoir en parallèle l'effet du produit sur les paramètres hémodynamiques mais aussi sur la fonction cardiaque.

Ainsi sur une période de 5 ans nous estimons à 10 études par an le besoin d'évaluation de composés sur le versant safety soit 900 animaux.

Toujours sur cette période de 5 ans, nous estimons réaliser 3 études chroniques par an combinant télémétrie et échographie et pour cela nous avons besoin de 675 animaux.

Au total 1575 animaux seront nécessaires sur la durée du projet (5 ans).

15367 Dans le procédé d'élaboration d'un kit de dosage immuno-enzymatique très sensible de l'hormone lutéinisante, la LH (Luteinizing Hormone), il est nécessaire d'utiliser du sérum de bélier ou de brebis hypophysectomisés. Ce kit de dosage applicable pour de nombreuses espèces animales ovidés, bovidés, porcins, canidés, murins, est utilisé par des laboratoires de recherche vétérinaire, publics ou privés, en France et à l'international. Il est utilisé également par des professionnels de l'élevage pour adapter de nouvelles conduites d'élevage dans le domaine de la reproduction chez la femelle comme chez le mâle. C'est le seul kit de dosage disponible dans le commerce permettant de doser de façon très précise la LH chez les animaux, sans utilisation de radio éléments, avec un même niveau de sensibilité, voire meilleur, que les dosages radio-immunologiques utilisés dans les laboratoires. La méthode de fabrication utilisée et nécessitant du sérum de bélier hypophysectomisé est la seule à permettre une diminution efficace des interférences non-spécifiques du plasma dans le dosage, et, de ce fait, d'atteindre un seuil de détection très bas, de l'ordre de 60pg/ml. Cette sensibilité très basse est nécessaire à l'analyse de la micro-pulsatilité par exemple, ou au dosage de la LH dans le lait. Nous avons essayé de remplacer l'hypophysectomie par un traitement chimique avec un premier type d'inhibiteur du GnRH. Les résultats répétés plusieurs fois n'ont pas

été concluants et ne permettent pas de doser la LH de façon suffisamment précise et sensible pour répondre au cahier des charges du kit. Nous voulons tester un autre antagoniste, afin d'évaluer son efficacité chez l'ovine.

Réduire Nous estimons nos besoins à 40 (30+10) béliers maximum sur 5 ans. Le nombre d'animaux a été calculé par rapport à nos besoins en terme de production de kit. Les béliers sont hypophysectomisés au fur et à mesure des besoins. A la fin des 5 ans d'autorisation, les béliers non utilisés resteront en élevage.

Les 40 béliers demandés correspondent à 30 béliers pour l'obtention de sérum hypophysectomisé et 10 béliers pour l'évaluation d'un nouvel inhibiteur du GnRH, en vue d'une hypophysectomie "chimique". Nous estimons à 10 béliers le nombre maximal pour mettre au point le protocole de traitement avec ce nouvel inhibiteur qui nécessitera un ajustement de la dose, du nombre d'injections et de la durée du traitement. La durée d'action de ce nouvel inhibiteur est de 7 semaines nous l'avons expérimenté chez le rat, mais nous n'en avons aucune donnée chez l'ovine. La durée d'action et la posologie seront mises au point en partant de celles que nous avons mises au point chez le rat mâle adulte.

Remplacer l'inhibition de l'hypophyse par voie chimique vise à remplacer l'approche chirurgicale de l'hypophysectomie.

Raffiner Nous avons essayé de remplacer l'hypophysectomie par un traitement chimique avec un premier type d'inhibiteur du GnRH. Les résultats répétés plusieurs fois n'ont pas été concluants et ne permettent pas de doser la LH de façon suffisamment précise et sensible pour répondre au cahier des charges du kit. Nous voulons tester un autre antagoniste, afin d'évaluer son efficacité chez l'ovine.

Si ce nouveau traitement s'avère efficace, l'utilisation de cet inhibiteur chimique remplacera l'hypophysectomie pour obtenir du plasma dépourvu de LH et de FSH.

Dans le cas d'un animal destiné à être hypophysectomisé, il vivra avec au minimum 1 de ses congénères avant et après hypophysectomie. Des dispositions (analgésie et anesthésie) seront prises pour éviter toute souffrance de l'animal pendant et après intervention. Certains raffinements seront apportés dans son lieu d'hébergement. Il sera parqué avec son congénère dans un espace ouvert couvert de paille régulièrement changée, comme en élevage. Il aura à boire à volonté et sera nourri comme en élevage. Il verra les autres animaux parqués dans les autres cases grâce à des barrières métalliques non pleines.

15368 Les examens d'imagerie médicale sont à la base de la prise en charge de patients souffrant de pathologies diverses, en particulier d'un cancer, pour pouvoir guider le traitement. Ces examens nécessitent souvent l'injection de molécules par voie intraveineuse pour améliorer leurs performances diagnostiques. Des chimistes et des biologistes travaillent ensemble pour proposer des molécules de plus en plus efficaces et sans effets secondaires.

Pour pouvoir proposer ces nouvelles molécules comme agent d'imagerie chez l'homme, des études *in vivo* sont indispensables (pas de remplacement possible par des études cellulaires).

L'objectif de ce projet est d'évaluer *in vivo*, chez le rat et la souris, les propriétés de contraste et de bio cinétique de ces molécules, leur stabilité et leur absence de toxicité.

En cas de réussite, un nouveau projet sera réalisé pour fonctionnaliser ces molécules dans le but d'améliorer le diagnostic chez des patients, notamment atteints de cancer.

Ce projet de recherche translationnelle nécessitera l'utilisation de 210 souris et de 428 rats répartis en 1 procédure de classe légère et 3 procédures de classe sans réveil sur une période de 5 ans. Aucun effet néfaste secondaire à l'injection de ces nouveaux produits n'est attendu, mais leur injection nécessitant chez les rats, la réalisation d'un geste chirurgical, les procédures avec réveil sont classées en gravité légère. Tous les animaux seront euthanasiés à la fin de l'étude, puisqu'ils auront subi un acte chirurgical ou que l'étude nécessite de prélever leurs principaux organes pour y doser le produit.

Les résultats de chaque procédure seront analysés au fur et à mesure. La poursuite de l'étude ne sera initiée que si les résultats de la procédure précédente sont positifs.

Des mesures de raffinement seront appliquées. Les animaux seront hébergés dans un milieu enrichi. Ils seront observés et surveillés quotidiennement afin de détecter rapidement tout signe de souffrance ou de douleur, qui, s'ils apparaissaient, enclencherait une prescription d'antalgiques. La persistance de douleur malgré les antalgiques conduira à l'arrêt des protocoles. Les doses injectées de complexes seront calculées pour n'engendrer aucun effet toxique tout en permettant d'atteindre les objectifs scientifiques.

Le nombre estimé de souris ou rats (réduit au minimum nécessaire pour l'obtention des résultats) est basé sur notre expérience et expertise dans l'élaboration de ce type d'étude.

15369 Chez les mammifères, l'horloge biologique principale est située dans l'hypothalamus et est responsable des rythmes biologiques circadiens. Cette horloge est synchronisée au cycle lumière-obscurité (LD). Les fonctions qu'elle régule peuvent être altérées par des perturbations du cycle LD (ex. travail posté, décalage horaire). De récents travaux chez l'Homme montrent un lien entre le jetlag social (c'est-à-dire le décalage chaque week-end du rythme veille-sommeil) et différents troubles métaboliques et comportementaux.

Le but du projet est d'étudier chez le rat l'impact sur le système circadien, et plus généralement sur l'organisme, d'un décalage hebdomadaire chronique du cycle lumière-obscurité. Pour comprendre les effets du protocole sur le système circadien de l'animal, nous étudierons une des principales sorties de l'horloge biologique, à savoir le rythme journalier d'activité locomotrice, ainsi que l'expression de certains gènes et la libération de molécules dans l'horloge principale et le reste du cerveau.

Le protocole auquel les animaux seront soumis sera le suivant nous imposerons aux rongeurs un rythme de veille-sommeil en modifiant le cycle lumière-obscurité qui sera retardé de trois heures chaque début de week-end puis avancé d'autant chaque lundi afin de reproduire les horaires de veille-sommeil observés chez l'Homme dans notre société.

L'analyse des effets de ce protocole sur le rythme journalier d'activité locomotrice (et donc sur l'horloge biologique) se fera via des capteurs infrarouges placés au-dessus de la cage de l'animal qui permettront de mesurer la quantité d'activité locomotrice chaque minute. A la fin de l'expérience, l'impact du protocole sur le rythme d'expression de certains gènes de l'horloge ainsi que sur la neurotransmission dans le cerveau sera étudié.

Le projet utilisera au total un nombre maximal de 96 rats. L'effectif a été déterminé dans le respect des règles statistiques en vigueur et de manière à obtenir une bonne reproductibilité des résultats. Aussi, après la mesure de l'activité locomotrice le cerveau est récupéré pour l'analyse d'expression des gènes et de la neurotransmission, évitant donc d'utiliser d'autres animaux. En ce qui concerne le raffinement de l'expérience, les animaux sont hébergés en cages individuelles avec du matériel d'enrichissement (nids en coton, bâtons à ronger). Les animaux sont suivis quotidiennement. Des points-limite prédictifs permettant de soustraire l'animal à la souffrance ont été établis. Afin de minimiser les conséquences de l'isolement, les animaux garderont le contact visuel et olfactif. Concernant le remplacement, il s'agit ici d'une étude comportementale et nécessite donc une approche in-vivo.

15370 Le lupus érythémateux disséminé (LED) est une maladie auto-immune (pathologie au cours de laquelle le système immunitaire réagit contre l'organisme) rare caractérisée par la production d'autoanticorps (anticorps dirigés contre l'organisme) pathogènes et associée à une inflammation de plusieurs organes. Le développement de cette maladie semble parfois lié à des facteurs génétiques. Ainsi, une mutation hétérozygote du gène ERN1, conduisant à une perte de fonction partielle de ce gène, a été décrite dans une famille comportant plusieurs membres atteints de lupus. Afin de mieux comprendre les conséquences de cette mutation sur le développement d'une autoimmunité, nous étudions un nouveau modèle transgénique murin portant la mutation d'Ern1 équivalente à celle décrite chez les patients. Ce modèle va nous offrir l'opportunité d'effectuer des

investigations impossibles chez l'Homme, notamment de comprendre les mécanismes du développement de l'inflammation et de l'autoimmunité lorsque cette mutation s'exprime, et d'explorer les mécanismes de production d'autoanticorps.

Ce projet comprend 3 objectifs

I. Etudier le phénotype des souris mutées, à l'état basal (phénotype des cellules immunitaires et développement d'une autoimmunité), en comparaison à des souris contrôles,

II. Etudier la réponse anticorps chez les souris mutées, en comparaison à des souris contrôles,

III. Etudier les mécanismes de la production d'autoanticorps chez des souris issues du croisement entre les souris mutées et un modèle transgénique murin (56R) permettant de suivre facilement les cellules produisant les autoanticorps, d'une part, et avec un autre modèle transgénique favorisant le développement d'une autoimmunité (B6 lpr/lpr), d'autre part.

Afin de respecter la règle des 3R, une réduction du nombre d'animaux utilisés a été décidée.

Nous prévoyons d'analyser des groupes de 10 souris pour chaque question posée, ce qui est minimum pour pouvoir réaliser des tests statistiques, soit 300 souris pour le projet global.

Pour répondre à l'objectif de raffinement, les souris seront hébergées en groupes sociaux, et dans des cages comportant des enrichissements (nids, barreaux).

De plus, avant chaque prélèvement sanguin ou injection, les souris seront anesthésiées. Enfin, les souris seront observées régulièrement et les dispositions adéquates seront prises si la souffrance des animaux devait atteindre les points limites. La règle du remplacement n'est pas applicable ici en effet, nous devons avoir recours à un modèle *in vivo* afin d'étudier les réponses immunes et la production d'autoanticorps qui mettent en jeu des coopérations cellulaires multiples dans les organes lymphoïdes tels que la rate et les ganglions. Pour ces raisons, nous ne pouvons avoir recours à l'utilisation de lignées cellulaires (cellules non primaires) *in vitro*. En ce qui concerne les modèles *in vivo*, la souris est le modèle approprié afin d'étudier les fonctions du système immunitaire, car les connaissances chez la souris sont très développées dans le domaine de l'immunité et de l'autoimmunité.

Ce projet pourrait conduire à une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques à l'origine de développement d'une autoimmunité, et à l'identification de nouvelles stratégies thérapeutiques pour ces patients.

15371 Les cellules Th17 sont des globules blancs qui ont un rôle controversé en cancérologie. Ceci s'explique par le fait que 2 familles de Th17 peuvent exister. Les Th17 dits régulateurs (Th17R) bloquent la réponse immunitaire antitumorale et favorise la progression des tumeurs. Les Th17 dits inflammatoires (Th17I) activent la réponse immunitaire antitumorale et participent au contrôle de la maladie.

Des résultats obtenus au laboratoire indiquent que les cellules Th17R qui sont déficientes pour une protéine appelée NLRP3 acquièrent des caractéristiques proches des cellules Th17I. Pour valider que les différences observées *in vitro* se manifestent par des différences fonctionnelles, nous analyserons les effets de ces cellules sur la croissance tumorale chez la souris.

Pour cela, nous utiliserons une souche de souris C57Bl6 déficientes pour le gène ROR γ t. Ces souris ne possèdent pas de cellules Th17. De ce fait nous pourrions étudier spécifiquement les effets des cellules Th17R contrôles et Th17R déficientes pour NLRP3 que nous injecterons à ces souris. Nous procéderons en 2 temps. Dans un premier temps, des souris recevront des injections de cellules Th17R ou Th17R déficientes pour NLRP3 afin de reconstituer leur « stock » en Th17. Les souris recevront ensuite soit une injection de cellules tumorales en sous cutanées (induisant une tumeur au site d'injection) soit en Intraveineux (induisant des foyers tumoraux dans les poumons). La croissance des tumeurs sous cutanées sera suivie au cours du temps. Les animaux ayant reçu les injections intraveineuses seront mis à mort après 11 jours (temps nécessaire pour évaluer les différences). Dans un second temps, nous réaliserons des expériences de thérapies cellulaires. Des souris recevront des injections de cellules tumorales (sous-cutanées ou intraveineuses) afin de mettre en place des tumeurs. Après 7 jours, une injection des Th17 contrôles ou Th17 déficientes

pour NLRP3 sera réalisée seule ou en combinaison avec un traitement par immunothérapie. Comme précédemment, les tumeurs sous cutanées seront mesurées tous les 2 jours. En ce qui concerne les souris ayant reçu des tumeurs au niveau des poumons, elles seront mises à mort à J13 permettant d'apprécier l'effet de la thérapie cellulaire. Au vu des résultats initialement obtenus *in vitro*, nous pensons que les Th17 déficientes pour NLRP3 pourraient avoir un effet anti tumoral marqué. Afin d'exploiter au mieux ces expériences, une analyse des populations immunitaires sera systématiquement effectuée après la mise à mort des animaux. Pour chaque expérience, 10 souris par groupes seront nécessaires et les expériences sont reproduites 2 fois. De ce fait, cette étude nécessitera 240 souris. Seule des femelles seront utilisées car il existe une différence dans la population de Th17 entre le mâle et la femelle chez la souris.

La mise en place de ce projet s'est attachée à respecter la règle des 3R. Tout d'abord, les expériences ne seront répétées que 2 fois et les rates, les ganglions et les tumeurs seront analysées sur les mêmes animaux ce qui permet donc de réduire le nombre d'animaux de l'étude. De plus, nous avons fait appel à un méthodologiste afin de déterminer au mieux le nombre minimal de souris requis pour que nos tests statistiques soient suffisamment puissants. Des études préliminaires ont été réalisées sur les cultures de cellules *in vitro* ont permis la caractérisation du phénotype des cellules *in vitro* limitant ainsi l'utilisation d'animaux (remplacement). Enfin, la totalité des procédures impliquant un inconfort potentiel des animaux (injections sous-cutanées ou intraveineuses des tumeurs et sacrifice) sera réalisée sous anesthésie permettant ainsi le raffinement de l'étude. Les souris seront hébergées à raison de 10 souris par cage. Les cages seront enrichies avec les éléments permettant aux souris d'avoir un comportement au plus proche de celui qu'elles auraient dans le milieu naturel (cachettes, de quoi faire un nid...). Cette étude nécessitera 240 souris.

15372 Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité en Europe. L'hypertension artérielle (HTA), facteur de risque majeur de ces maladies, se caractérise par une augmentation chronique de la pression artérielle (PA). Une augmentation de la PA va engendrer une adaptation structurale et fonctionnelle des artères, phénomène appelé remodelage artériel. Ce remodelage va largement contribuer à l'aggravation de l'HTA, qui est considérée aujourd'hui comme un tueur silencieux. Il apparaît donc indispensable de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires du remodelage artériel lors de l'HTA permettant d'identifier de nouvelles cibles pour traiter et/ou prévenir cette pathologie.

Impliquant la physiologie du vaisseau dans son ensemble, l'HTA nécessite le recours à l'expérimentation animale. C'est pourquoi des modèles animaux sont nécessaires. Ces modèles d'HTA sont très proches des pathologies développées chez l'homme (augmentation de la pression artérielle, hypertrophie cardiaque, remodelage structurel et fonctionnel des artères) et permettent d'obtenir des résultats extrapolables à l'homme.

Dans ce contexte, nous nous intéressons au rôle l'homéostasie sodique dans l'étude de l'HTA qui est contrôlé par l'expression et la fonction de nombreux canaux ioniques dont font partie les canaux sodiques dépendant du potentiel (canaux Nav).

Au laboratoire, nous avons montré que les canaux Nav étaient impliqués dans la vasodilatation des vaisseaux chez des souris normotendues. Nous avons également observé une diminution de leur niveau d'expression dans l'aorte remodelée de souris hypertendues (modèle AngII). Notre projet vise à étudier l'impact du remodelage artériel dans deux modèles d'HTA (AngII et DOCA-Salt) sur l'expression, l'activité et la fonction des canaux impliqués dans l'homéostasie sodico-calcique chez la souris C57Bl6J. Si l'expression et/ou l'activité électrique et/ou la fonction des canaux ioniques est modulée en réponse à une augmentation de pression, cela sera le reflet indirect d'une implication fonctionnelle de ces canaux dans l'HTA. Ils pourront être alors identifiés comme des cibles thérapeutiques pour le traitement de l'HTA, comme ils le sont déjà dans certaines formes d'épilepsie et d'arythmie.

Nous appliquons la règle des 3R. Pour le point « Réduire », nous avons estimé que 588 animaux au maximum seront nécessaires à ce projet. Nous utiliserons des tests non paramétriques type Mann et Whitney ou Kruskal-Wallis en fonction du nombre de groupes à comparer. www.xlstat.com. Pour le point « Raffiner », toutes les procédures chirurgicales seront accompagnées d'une

analgésie pré et postopératoire (injection de buprénorphine à 0,05 mg/Kg ou 0,1 mg/Kg suivant la sévérité de la chirurgie). L'animal sera suivi au réveil et dans les premières heures suivant l'opération, puis quotidiennement. Une grille de score pour l'évaluation de la douleur sera utilisée avec détermination du point limite. Nous ne pouvons pas remplacer ce modèle par un modèle *in vitro* car l'HTA et le remodelage vasculaire associé mettent en jeu la physiologie du vaisseau ainsi que le système nerveux et immunitaire de l'animal. Nous raffinons nos conditions d'expérimentation et d'hébergement pour le bien-être de nos animaux. Le comité du bien-être de l'animalerie sera consulté tout au long de la réalisation du projet. Les animaux sont hébergés dans des cages enrichies (sopalin, rouleaux) aux normes suivant l'âge et le poids des animaux. Ce projet conduira à une meilleure compréhension de l'implication de l'homéostasie sodico-calcique et en particulier le rôle des canaux Nav dans l'HTA et le remodelage associé et permettra d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques de l'HTA.

15373 Un modèle animal de l'infection par le SARS-Cov2 est nécessaire à la meilleure compréhension de la physiopathologie de la maladie. De plus, un modèle animal permettrait de tester de nouvelles thérapies, dont la chloroquine, et d'en comprendre les mécanismes d'actions. Notre projet est basé sur la forte homologie du récepteur au SARS-Cov2 ACE2 entre souris et homme (84%), sur de nombreuses études publiées montrant la réplication du SARS-Cov chez la souris et sur notre expertise des souris humanisées. Nous voulons établir un modèle de l'infection en injectant des cellules de sang périphérique de patients infectés par le SARS-Cov2 dans des souris immunodéficientes de souche NOD.SCID.gc-null (NSG). Dans ce contexte, le virus apporté par les cellules humaines pourrait se répliquer dans les poumons sous l'effet de l'activation des lymphocytes T induite par le contexte lymphopénique et la réaction du greffon contre l'hôte (GVH). Le premier objectif du projet sera donc de déterminer si le modèle des souris humanisées est susceptible à l'infection par le SARS-Cov2. Le second objectif du projet sera de déterminer si la pathologie pulmonaire est aggravée à partir d'échantillons de patients infectés comparés à des échantillons de sujets non infectés. Enfin, nous déterminerons si et comment la Chloroquine (CQ) pourrait impacter la charge virale et la pathologie pulmonaire à travers son action bien connue sur l'inflammation et l'activation immunitaire. Le projet permettra de mieux apprécier le rôle bénéfique ou destructeur des lymphocytes T dans la pathologie de l'infection au SARS-Cov2 et ainsi de proposer des thérapies adaptées.

Pour chacun de ses objectifs, nous utiliserons un nombre adapté de souris, de façon à réduire le nombre d'animaux utilisés à son strict nécessaire (3R). Pour l'objectif 1, 10 souris seront nécessaires, de façon à réaliser la greffe de PBMC de 5 patients différents (par groupe de 2 souris), permettant d'observer la variabilité due aux patients et la reproductibilité du modèle. Les souris seront euthanasiées six jours après injection des PBMC, avant les signes de GVH, permettant de limiter la douleur dans ce groupe. Pour l'objectif 2, 20 souris seront utilisées, divisées en deux groupes en fonction de la disponibilité des donneurs sains ou infectés (au moins 3 donneurs de chaque type seront utilisés). Pour l'objectif 3, 20 souris seront aussi utilisées pour greffer des cellules de donneurs infectés, divisés en deux groupes traités ou non avec la CQ (au moins 3 donneurs infectés seront utilisés). Pour ces deux objectifs, la survie des animaux étant un indicateur essentiel du succès du traitement ou de la plus forte réponse immunitaire dans le poumon avec des échantillons de patients infectés, un suivi du poids et de l'état général des souris sera réalisé tous les 2 jours. Les souris ayant perdues plus de 20% de leur poids initial à deux temps de mesure consécutifs seront euthanasiées et incluses comme mortes dans les analyses statistiques de survie. Un total de 50 souris sera donc nécessaire pour réaliser les 3 objectifs du projet. Malheureusement, il n'est pas possible de remplacer le modèle animal par des études *in vitro*, le modèle animal constituant le cœur de ce projet (Remplacer). Le nombre minimal de souris est prévue pour garder une robustesse statistique (Réduire). Chaque souris sera analysée en détail, que ce soit du point de vue virologique, immunologique ou histologique, permettant de raffiner l'étude (Raffiner).

15374 Les Leucémies Aiguës Lymphoblastiques T (LAL-T) sont des cancers agressifs du sang qui touchent les enfants et les jeunes adultes (~20-30 ans) et qui sont de pronostic sombre. Il est

indispensable de comprendre les mécanismes par lesquels la leucémie se développe afin de développer des traitements efficaces. Un certain nombre de gènes favorisant le développement des LAL-T sont connus. Notamment, on sait d'après les données de la littérature que 2 gènes (A & B) sont des oncogènes dont la dérégulation individuelle n'a aucun effet, alors que leur dérégulation combinée (A+B) entraîne le développement d'une leucémie agressive et fatale.

Nos données préliminaires nous permettent de faire l'hypothèse que la suppression d'un autre gène (C), empêche le développement de la leucémie. Il n'existe pas de modèle *in vitro* ou *in silico* permettant d'en apporter la preuve formelle. Il est donc indispensable de développer un modèle animal pour vérifier si le profil A+B-C réduit ou ralentit la survenue de leucémie par rapport aux animaux A+B. La compréhension de ces mécanismes moléculaires représente un intérêt thérapeutique majeur car ~50% des patients atteints de LAL-T expriment le gène A.

Pour ce faire, deux lignées de souris génétiquement modifiées seront créées une lignée « contrôle » connue, dans laquelle une dérégulation des gènes A+B a été introduite et dont on sait qu'elle développe une leucémie aigüe agressive et fatale et une lignée « test » dont on ne sait rien sur le plan clinique, porteuse de la dérégulation A+B à laquelle s'ajoute la suppression de l'expression du gène (C). L'hypothèse de ce projet est que le groupe test engendrera un ralentissement de la survenue de la leucémie. En conséquence le gène (C) pourrait être une cible thérapeutique majeure pour la leucémie LAL-T.

Le but est de comparer le délai de survenue de la leucémie entre les deux lignées A+B et A+B-C. Le nombre de souris nécessaires à l'expérimentation est de 60 au total pour une étude sur 3 ans. Ce nombre permet d'obtenir de manière certaine l'information scientifique souhaitée tout en étant réduit au maximum. Il est à noter que dans un souci d'optimisation, les animaux contrôles (A+B) seront utilisés après sacrifice pour réaliser des expériences *in vitro* et valider notre hypothèse.

Les animaux seront maintenus en cage avec au moins deux animaux pour préserver leurs interactions sociales, et un enrichissement (cabane, coton) pour assouvir leur besoin ludique. Les souris bénéficieront d'une surveillance clinique quotidienne afin de détecter les éventuels signes d'inconfort, de souffrance ou d'angoisse et d'une surveillance clinique hebdomadaire.

Nous savons que l'apparition de la leucémie peut être détectée de manière fiable et très précocement par un prélèvement sanguin régulier. Il s'agit d'un geste peu invasif, et peu douloureux.

L'expérimentation sera stoppée (sacrifice de l'animal) lorsque le taux sanguin de cellules pathologiques aura atteint 80% ou pour le cas éventuel où l'animal présenterait des signes cliniques de souffrance, ou encore lorsque les animaux atteindront l'âge de 60 semaines.

Nous savons très précisément que les souris contrôles (A+B) développent la leucémie à partir de 12 semaines, que 50% d'entre elles développent la maladie à 19 semaines, et 100% à 24 semaines. En conséquence, la surveillance biologique ne débutera qu'à 10 semaines pour éviter l'inconfort des animaux lié à un prélèvement biologique avant cet âge. En revanche, il est indispensable de prolonger l'expérience au-delà de 24 semaines afin d'objectiver le ralentissement de la leucémogénèse. Toutefois, il n'est pas nécessaire de prolonger l'expérience au-delà de 60 semaines car après cette période la valeur statistique du résultat sera certaine. La durée du projet sera de 3 ans en tenant compte du temps nécessaire pour élever les souris et de la durée de l'expérience sera de 60 semaines.

15375 De nombreux travaux de recherches démontrent l'intérêt d'utiliser des nanomatériaux pour améliorer les performances de traitements existants ou pour permettre le développement de traitements innovants basés sur l'utilisation de nouvelles molécules qui nécessitent leur association à un transporteur pour leur activité pharmacologique. Cependant, les développements cliniques de ces systèmes appelés nanomédecines sont restreint et de nombreux obstacles restent à lever pour étendre leur utilisation. Cet état de fait s'explique par le manque de données permettant de rationaliser leur conception. En effet, jusqu'ici, les nanomédecines étaient développées sur des bases empiriques et les connaissances reliant les propriétés de ces systèmes à leur activité et sécurité reste spartiates. De nombreux auteurs soulignent la nécessité de mener des études systématiques qui permettront de préciser les caractéristiques physico-chimiques à donner à une

nanomédecine pour répondre au besoin de biodistribution du cahier des charges définies pour le développement.

Le projet que nous proposons est une réponse à ce besoin. Il propose d'étudier de manière systématique la biodistribution et la pharmacocinétique d'une série de nano-objets pour lesquels la caractérisation physico-chimique a été particulièrement poussée. La famille de nano-objet constituant cette série dérive d'une nanoparticule polymère qui a fait l'objet d'un développement clinique de Phase III démontrant l'intérêt de ces formulations. Les particules de cette série sont toutes composées d'un même cœur de polymère et diffèrent par leur couronne qui présente des propriétés de surface différentes qui vont influencer le devenir *in vivo* de la particule. Nous avons déjà montré que ceci avait des conséquences sur l'interactions des nanoparticules avec les cellules et les protéines du sang et sur l'activation ou non du système immunitaire.

L'objectif du projet sera d'étudier la pharmacocinétique de notre série de nano-objets, c'est-à-dire leur devenir dans l'organisme après administration par voie intra-veineuse, pour collecter un maximum de données (temps de résidence dans le sang, accumulation dans les différents organes). Cette multitude de données sera utilisée par la suite pour alimenter une base de données et construire des modèles qui pourront prédire, sur des bases rationnelles, le devenir *in vivo* des nano-médicaments en fonction des caractéristiques physico-chimiques de leur couronne. Ces données pourront aussi être utiles dans de futurs travaux pour concevoir des nanomédecines plus efficaces sans avoir systématiquement recours à l'animal.

La pharmacocinétique et la biodistribution de nanomédicaments *in vivo* sont le résultat d'interactions très complexes entre les nanomédicaments et les différents milieux et barrières biologiques qu'ils traversent. Le recours à l'animal est donc incontournable pour évaluer le devenir de nos nano-objets *in vivo* qui vont interagir ou pas avec les éléments du système immunitaire en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques. Les procédures se dérouleront sur des rats qui ont l'avantage d'avoir un système immunitaire proche de celui de l'Homme conférant ainsi aux résultats de cette étude une meilleure performance translationnelle. La pharmacocinétique et la biodistribution seront couplés afin de diminuer le nombre d'animaux utilisés. Les procédures expérimentales seront menées sur un nombre limité mais nécessaire d'animaux grâce à une planification statistique minutieuse et ont été conçues de sorte à supprimer toute souffrance psychique et/ou physique des animaux. Le nombre a été évalué à 125 rats.

Le bien-être des animaux sera également pris en compte. Les animaux seront hébergés en groupes dans un environnement enrichi et leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer qu'il n'y a aucun signe de stress. Des méthodes d'anesthésie sûres et efficaces seront utilisées pour exécuter toute intervention douloureuse (injection et prélèvement sanguin).

15376 Le côlon est un organe qui héberge une communauté complexe de microorganismes que l'on appelle microbiote. Des modifications du microbiote, sont observées et impliquées dans de nombreuses pathologies et notamment les MICI (Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin qui comprennent la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique), caractérisées par une inflammation chronique de la paroi du tube digestif. C'est pourquoi, un dialogue permanent entre l'hôte et le microbiote est essentiel dans le maintien de l'équilibre fonctionnel de l'intestin (homéostasie intestinale). En plus de la présence du microbiote, le contenu intestinal recèle d'autres éléments dont les micro-ARN (ou miARN, petites molécules présentes dans les cellules et qui freinent l'expression des gènes). Les miARN circulants (sanguins) ont récemment été étudiés pour leur rôle de marqueur de l'inflammation dans la colite expérimentale chez la souris et dans les MICI chez l'homme. De plus, des données nouvelles de la littérature ont mis en évidence que les niveaux d'accumulation de certains miARN contenus dans les selles (miARN fécaux) étaient affectés par la présence et la nature du microbiote. Le rôle déjà établi des miARN au niveau de nombreuses fonctions physiologiques dans l'organisme et la proximité des miARN fécaux avec les bactéries du microbiote laissent penser que les miARN et les bactéries du tube digestif peuvent interagir et influencer l'état de santé intestinal.

L'objectif principal de notre projet est d'étudier le rôle des miARN présents dans le contenu intestinal, leur rôle comme intermédiaire entre l'hôte et le microbiote et leur potentiel anti-inflammatoire. Nous chercherons à comprendre le dialogue entre miARN et microbiote et les rôles respectifs de chacun dans l'inflammation intestinale. Pour mener à bien ce projet, nous utiliserons des souris dépourvues de microbiote (souris axéniques ou souris traitées avec des antibiotiques) que nous traiterons avec les miARN d'intérêt. En parallèle, des modèles de souris qui développent une colite spontanée ou induite seront utilisés afin de comparer les miARN fécaux des souris malades par rapport aux souris saines. Nous traiterons des souris qui présentent une colite avec des miARN administrés dans l'eau de boisson afin d'en déterminer le potentiel rôle bénéfique. Enfin, les ARN fécaux de patients atteints de MICI seront administrés à des souris dépourvues de miARN afin de comprendre le rôle des miARN fécaux dans les MICI.

Ce projet se déroulera sur une période de 5 années et nécessitera un effectif total de 660 souris âgées de 5-8 semaines provenant d'un fournisseur agréé. Chaque procédure se clôturera par l'euthanasie des souris.

Notre démarche scientifique s'accompagne d'une démarche éthique pour laquelle nous veillerons à respecter la règle des 3R (Réduire, Raffiner, Remplacer). Une attention particulière sera portée au maintien du bien-être des animaux via une surveillance quotidienne effectuée par le personnel compétent de l'animalerie et/ou les expérimentateurs. Bien que le remplacement total des animaux soit impossible pour mener à bien notre projet qui nécessite un environnement physiologique complexe, nous avons mis au point un système de culture *in vitro* du microbiote afin de limiter au maximum l'utilisation d'animaux. L'effectif proposé tient compte du calcul statistique prévisionnel permettant d'obtenir le nombre d'animaux nécessaire et suffisant pour démontrer une différence significative. Dans le cadre du raffinement, les souris seront surveillées quotidiennement pendant toute la durée du protocole par du personnel compétent. Les mesures nécessaires à la prise en charge de la douleur potentielle des souris avec colite seront adaptées en fonction de l'état des animaux (analgésie et suivi des signes de mieux/mal être avant et après le traitement). Les effets du traitement seront contrôlés par une surveillance selon un score standardisé. Ce score (prenant en compte la variation du poids de l'animal, son apparence externe, les signes cliniques mesurables et le changement de comportement) correspond à une grille d'évaluation clinique permettant de prendre des mesures progressives (points limites) en fonction de l'élévation du score (augmentation de la fréquence des observations, administration de solution saline pour lutter contre la déshydratation, administration d'antalgiques pouvant être renouvelé toutes les 12h, euthanasie précoce). Ainsi, le protocole expérimental pourra être atténué voire suspendu en cas de mauvaise tolérance ou de souffrance des animaux. L'environnement des animaux sera enrichi afin de leur permettre d'avoir un comportement le plus naturel possible (cotons, maisons, cycle jour/nuit).

15377 Des études ont montré que le système nerveux périphérique pouvait réguler le système immunitaire (SI). De quelle façon ? La libération des neurotransmetteurs (tels que l'acétylcholine, l'adrénaline ou la noradrénaline) lors de la stimulation de nerfs périphériques peut agir directement sur les cellules du système immunitaire. Il a ainsi été montré que les organes du système immunitaire (rate et ganglions lymphatiques) reçoivent une innervation importante de nerfs périphériques. Par ailleurs, on peut détecter l'expression de récepteurs à des neurotransmetteurs par les cellules du système immunitaire. Dès lors, l'intervention sur l'activité des nerfs périphériques dans le but de modifier l'activité du système immunitaire est envisageable. Ainsi, chez l'homme la stimulation de nerfs périphériques est déjà utilisée pour le traitement de maladies comme l'épilepsie ou la dépression. De nos jours, plus de 100 000 patients dans le monde sont implantés avec des micro-stimulateurs.

Les effets de ces électrostimulations du nerf vague sont actuellement recherchés dans la prévention du choc septique qui est la première cause de mortalité en milieu hospitalier. En effet, il a été montré que, dans des modèles d'inflammation chez la souris, l'électrostimulation du nerf vague induit une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires. Ces résultats suggèrent donc que la stimulation du système nerveux sympathique pourrait prévenir le choc septique chez l'animal.

Nous cherchons dans ce projet à mieux comprendre les mécanismes mis en jeu. En pratique, le projet consiste à implanter une électrode de stimulation au niveau des nerfs de la rate et du nerf vague et à réaliser une électrostimulation chez des animaux transgéniques. La comparaison de la réponse inflammatoire entre les animaux transgéniques et les animaux sauvages permettra de mieux comprendre les mécanismes de cette inhibition.

Pour cela nous utiliserons des souris modifiées génétiquement au phénotype non dommageable qui possède les caractéristiques suivantes

1- absence de lymphocytes T circulants (procédure n°1)

2 -absence d'une enzyme nécessaire à la production d'acétylcholine dans les lymphocytes CD4 (procédure n°2)

Le nombre total de souris utilisées pour ce projet est au maximum de 144. Nous réduirons le nombre maximum d'animaux utilisés en ne réalisant la procédure 2 que si la procédure 1 donne un résultat positif. Par ailleurs des raffinements sont proposés notamment pour limiter la souffrance animale en mettant en place des protocoles adaptés d'anesthésie et d'analgésie complétés par un suivi postopératoire comprenant la mise en place des points limites précoces et adaptés.

Nous ne pouvons, pour ce projet, remplacer le modèle animal car l'étude présentée nécessite la préservation de l'intégrité du système immunitaire et nerveux de l'animal.

15378 La maladie de Marek (MD) est associée à un lymphome T, un cancer mortel chez la poule. Cette maladie hautement contagieuse est due à un alphaherpesvirus du genre *Mardivirus*, le virus de la maladie de Marek (MDV). Bien que la vaccination soit largement utilisée depuis les années 1970, cette maladie reste une maladie d'importance économique chez la poule au niveau mondial. La persistance de l'infection est attribuée au fait que les vaccins préviennent la formation des tumeurs mais n'empêchent pas la réplication du virus et son excrétion dans l'environnement. Aussi trouver des vaccins qui bloqueraient la maladie, mais aussi l'excrétion virale, est l'un des objectifs prioritaires de la recherche actuelle sur le MDV. Le follicule plumeux est le seul tissu connu capable de multiplier le virus de façon très efficace, ce qui permet sa diffusion dans l'environnement. Les causes de cette spécificité restent inconnues.

Le présent projet vise à étudier cette spécificité ainsi que la pathogenèse virale à l'aide de moyens innovants d'imagerie et d'analyse d'interaction hôte-pathogène.

Dans ce dernier cas, nous utiliserons une nouvelle méthode (appelée « BioID ») pour identifier les protéines cellulaires impliquées dans la réplication du virus, sa pathogenèse et son excrétion dans l'animal vivant. La méthode est bien utilisée en culture cellulaire, mais n'en n'est qu'à ses débuts *in vivo* et, surtout, n'a jamais été utilisée en infectiologie sur l'animal vivant. Nous comptons procéder en deux temps 1) mettre au point les conditions optimales pour le fonctionnement de BioID chez la poule en contexte infectieux et 2) se servir de BioID dans les conditions précédemment définies pour identifier les facteurs de l'hôte impliqués dans la pathogenèse et l'excrétion de MDV.

Afin de mieux caractériser la production de particules virales de MDV dans les follicules plumeux et sa dynamique par imagerie, nous utiliserons une nouvelle approche avec dissection des follicules plumeux à partir d'animaux infectés. Dans un 1er temps, nous utiliserons un virus fluorescent ayant les caractéristiques d'un virus sauvage. Nous caractériserons ensuite des virus MDV mutants marqués déficients pour la transmission ou des virus vaccinaux marqués afin de les comparer au virus de référence, précédemment étudié.

Enfin nous visons à développer des vaccins marqués permettant une vérification de la prise vaccinale à partir de plumes par un test simple et peu coûteux. Pour cela, nous testerons deux types de marqueurs dans le contexte génomique des deux vaccins les plus utilisés en élevage.

Les moyens mis en œuvre pour respecter la règle des 3R seront les suivants

- Remplacement Il n'existe à ce jour aucune méthode *in vitro* pour reproduire la tumorigenèse et l'excrétion virale dans la peau et les follicules plumeux de poule, et donc de remplacer l'expérimentation *in vivo*

- Réduction La plupart des expériences de ces protocoles utilisent le minimum d'animaux requis, à savoir 2 ou 3 animaux par lot. En ce qui concerne les expériences sur les virus non pathogènes, une estimation du nombre d'animaux minimum nécessaire à la réalisation de ces expériences a été faite. Soulignons que l'utilisation de tels vaccins éviteraient de tuer des animaux pour mesurer la prise vaccinale par la technique standard (PCR sur rate).

- Raffinement De par la nature infectieuse de l'expérimentation envisagée, l'hébergement des animaux sera réalisé en isolateur pendant toute la durée de l'infection. Afin d'assurer le bien-être des animaux, ces isolateurs auront une taille adaptée à leur nombre et à leur âge et un enrichissement (jouets suspendus) y sera installé. Au cours de cette étude, seul du personnel très expérimenté manipulera les animaux afin de réduire leur stress.

Ce projet nécessitera l'utilisation de 89 poules.

15379 La myéline est une membrane grasse essentielle formée de plusieurs couches, qui isole chaque nerf du cerveau et de la moelle épinière comme une gaine plastifiée entourant un fil électrique. Cette enveloppe protectrice assure la conduite rapide et normale des messages nerveux d'une partie du corps à une autre. La conduction rapide des influx nerveux le long de ces faisceaux est essentielle à la plupart des fonctions motrices, sensorielles et intégratives du système nerveux central (cerveau, cervelet et moelle) et périphérique (nerfs).

On parle de démyélinisation en cas d'altération anormale de la myéline. Lorsque cette enveloppe est endommagée, les conséquences sont très visibles et peuvent être dramatiques. Ainsi, la vision, l'ouïe, la parole, la motricité ou la mémoire peuvent être perturbées ou paralysées. Dans de nombreux cas, une paralysie totale ou une mort prématurée sont à redouter.

Chaque année, des milliers d'enfants ou de jeunes adultes sont victimes de maladies de la myéline qui attaquent la membrane de façon sélective des maladies génétiques comme les leucodystrophies, ou des maladies auto-immune comme la sclérose en plaques. Les pathologies de la myéline sont invalidantes, douloureuses et/ou handicapantes, ce qui peut engendrer des conséquences socioéconomiques graves pour les patients et la société d'une manière générale (souffrance physique et psychologique importante, dépression, anxiété pathologique, manque de productivité, perte d'emploi, prise en charge financière élevée pour la sécurité sociale).

Le but du projet de recherche présenté ici, est d'utiliser une approche pluridisciplinaire et translationnelle pour développer dans des modèles expérimentaux de pathologies de la myéline, des stratégies thérapeutiques efficaces et novatrices, permettant de combattre les causes de la déficience de la myélinisation et de la souffrance axonale. Ce projet permettra le transfert d'hypothèses physiopathologiques vers la clinique et inversement.

Pour cela, il faudra tout d'abord étudier et comprendre les mécanismes qui sont à l'origine des anomalies de la myéline, en utilisant les outils technologiques de l'Unité de recherche, qui permettront à la fois le suivi de l'évolution de la pathologie de la myéline, mais aussi sa réparation. Des modèles animaux sont notamment développés dans ce but au laboratoire (dans le respect des règles de 3R), pour étudier la réparation de la myéline et la neuroprotection. Nous testerons ainsi l'immunisation par la protéine MOG (Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein) qui permet de reproduire la forme de la maladie évoluant progressivement sans poussées, et/ou l'immunisation par la protéine PLP (Protéolipidique protein) qui est proche des formes rémittentes de la maladie. Ces 2 approches étant utilisés et maîtrisés depuis des années au laboratoire.

Réduire 10 animaux par condition expérimentale et 10 animaux pour les groupes véhicules contrôles seront utilisés dans les expériences de score clinique. Ce nombre étant nécessaire et suffisant pour valider statistiquement les expériences. Le nombre total de souris utilisées pour ce projet sera de 2400 au maximum, sur 5 ans.

Raffiner les protocoles sont optimisés lors des expériences *in vivo* pour que, chez un même animal, plusieurs paramètres soient étudiés (score clinique, tests de motricité,). De plus, des études de biologie moléculaire, de biochimie et d'immuno-histochimie sont prévues sur les tissus prélevés en fin de procédure, après la mise à mort des animaux.

Des points limites pour les animaux seront évalués 3 fois par semaine selon une liste de critères définis, pour détecter des signes de douleur et éviter toute souffrance. Par contre, le poids sera évalué tous les jours (1 pesée par jour), en raison du risque élevé de variations dans ce type de protocole. De plus, un score clinique sera également établi chaque jour, en évaluant les souris quotidiennement selon une échelle d'évaluation clinique, afin de suivre l'évolution de l'apparition des symptômes de la maladie. Enfin, des points limites prédictifs ont été établis afin de soustraire l'animal à la souffrance.

Les souris sont maintenues en groupe de 2 minimum par cage pour maintenir une interaction entre individus. L'environnement d'élevage est enrichi à l'aide de carrés de cellulose pour la construction des nids et favoriser l'activité. Les souris ont accès ad libitum à la nourriture et à de l'eau filtrée. De plus, le nourrissage des animaux sera facilité en leur donnant quotidiennement une nourriture adaptée à leur état.

Remplacer les mécanismes biochimiques et moléculaires mis en jeu dans nos études sont étudiés sur des cultures cellulaires. C'est ainsi que nous avons développés plusieurs types cellulaires en adéquation avec différentes pathologies par exemple les cellules Jimpy 158 comme modèle d'atteintes myéliniques. Mais même si l'utilisation de lignées cellulaires permet de proposer certaines hypothèses, celles-ci doivent être validées dans un modèle *in vivo*, qui prend en compte l'ensemble des mécanismes physiologiques de l'organisme et leurs effets sur les traitements étudiés environnement proche et structure des organes, réaction du système immunitaire, effets secondaires, impact sur la survie, etc. Le modèle murin est préférentiellement choisi car celui-ci est développé depuis de nombreuses années et possède de multiples avantages nombreux modèles génétiquement modifiés disponibles et maîtrisés, génétiquement proche de l'homme (plus de 90% d'homologie).

15380 Le but de ce projet est d'étudier quelles sont les structures cérébrales qui modulent l'activité du système dopaminergique (DA) méso-cortico-limbique (de l'aire tegmentale ventrale). En effet, les neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale (VTA) jouent un rôle majeur dans les comportements motivationnels, et leur rôle dans de nombreuses pathologies psychiatriques, telles que l'addiction, la schizophrénie, le stress pathologique et la dépression a été démontré dans de nombreuses publications. En particulier des modifications de l'activité électrique des neurones dopaminergiques ont été démontrées, avec une augmentation de cette activité dans la schizophrénie, ou une diminution dans la dépression par exemple. Il est à noter que l'activité électrique des neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale est modulée par des afférences provenant de différentes structures cérébrales. Par exemple, des études antérieures ont montré que l'activité du noyau basolatéral de l'amygdale (BLA) est élevée en conditions de stress et que cette activation entraîne une diminution de l'activité de la population DA, confirmée par des enregistrements électrophysiologiques unitaires *in vivo* chez l'animal anesthésié. Cependant, il n'y a pas de projection directe de la BLA vers la VTA. L'un des candidats qui pourrait jouer le rôle de relai est le noyau central de l'amygdale (CeA), qui reçoit des afférences de la BLA et qui est composé de neurones de projections GABAergiques.

Par conséquent, dans ce projet nous explorerons l'hypothèse selon laquelle une diminution de l'activité des neurones DA de la VTA induite par la BLA est médiée par la CeA. Nous examinerons le rôle de la BLA et de la CeA dans la régulation de l'activité de la population des neurones DA avec des enregistrements électrophysiologiques *in vivo* chez le rat anesthésié, et des études comportementales.

Ce projet est constitué de 4 procédures

La première procédure correspond à des enregistrements électrophysiologiques *in vivo* chez le rat anesthésié.

La 2ème procédure correspond à l'exposition des animaux à des cages opérantes pour de l'auto-administration de nourriture.

La troisième procédure correspond à une chirurgie qui permettra l'implantation de guide-canules

La quatrième correspond à l'exposition des rats à un entraînement d'auto-administration de nourriture puis un test de rechute.

Dans ce projet, nous avons pris en considération la règle des 3Rs (remplacer, réduire et raffiner). Ce type de recherche, visant à comprendre les bases d'un processus psychobiologique, peut-être uniquement mené sur un animal vivant (remplacer). Nous minimiserons le nombre d'animaux utilisés par des méthodes expérimentales validées et reproductibles ainsi que des méthodes statistiques de type ANOVA et un calcul de puissance (réduire). Les animaux seront hébergés dans des cages ventilées, transparentes avec température et humidité contrôlées, et un enrichissement dans leur cage (raffiner). Une prise en charge de la douleur sera mise en place pour les animaux subissant une chirurgie (raffiner). Nous avons calculé que pour cette étude 380 rats seront nécessaires pour obtenir des données qui seront analysables statistiquement. Cette recherche fournira des informations critiques pour la compréhension des mécanismes sous-jacents à l'anhédonie et la perte de motivation et pourra avoir un impact sur la prise en charge des maladies psychiatriques chez l'Homme.

15381 La maladie de Parkinson est la deuxième pathologie neurodégénérative après la maladie d'Alzheimer et affecte plus de 6 millions de personnes dans le monde. Elle résulte de la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la substance noire pars compacta (SNc) qui innervent le striatum, structure clé des ganglions de la base, ensemble de structures sous-corticales impliquées dans les fonctions cognitivo-motrices. La dénervation dopaminergique des ganglions de la base entraîne des modifications pathologiques de leur activité associée à des symptômes moteurs tels que la bradykinésie (ralentissement moteur), l'akinésie (déficit d'initiation du mouvement) et des tremblements) et des troubles émotionnels et cognitifs. Le traitement médicamenteux de la maladie de Parkinson, comme la dopathérapie (précurseur de la dopamine), entraîne à long terme des effets très invalidants et un traitement chirurgical visant à réguler l'activité neuronale anarchique de certains noyaux comme le noyau subthalamique (NST) par stimulation cérébrale profonde (SCP) peut être proposé. Bien que la SCP soit une option de choix pour traiter les patients parkinsoniens âgés, son utilisation est limitée par l'apparition possible d'effets secondaires, la durée de vie des piles du stimulateur implanté et les coûts de la chirurgie. Une alternative à cette thérapie serait d'activer ou de réduire au silence des neurones précis du cerveau par une approche optogénétique. Développée en 2005, l'approche optogénétique consiste en l'expression, génétiquement ciblée dans certains neurones d'intérêt, d'opsines; des protéines issues d'algues ou de bactéries, ayant la particularité d'être photoactivables par une stimulation lumineuse à une longueur d'onde donnée. Selon l'opsine utilisée et la longueur d'onde choisie pour les activer, l'activité des neurones sera augmentée ou diminuée, et modifiera le comportement de l'animal dans un sens ou un autre. Nous avons développé et utilisé cette technique dans un modèle murin de la maladie de Parkinson et montré l'importance des interneurons cholinergiques (CINs) au sein du striatum dans l'expression des déficits produits par la lésion des neurones dopaminergiques.

Notre projet vise à tester *in vivo* un prototype miniaturisé (de quelques μm^3), qui permettra à la fois de stimuler par optogénétique les neurones d'intérêt, d'enregistrer les activités neuronales et d'injecter des nanovolumes de différentes substances (L-DOPA, anti-inflammatoire) chez les souris vigiles sans contention et de valider son efficacité sur les symptômes moteurs de la maladie de Parkinson. Par ailleurs, nous chercherons à déterminer si la modulation par optogénétique de l'activité neuronale dans d'autres structures des ganglions de la base, comme le globus pallidus externe (GPe), peut représenter une piste thérapeutique alternative à la SCP du NST. En effet, le GPe situé au centre des ganglions de la base a longtemps été considéré comme un noyau relais, connectant les structures d'entrée et de sortie de ces noyaux. Cependant, des données récentes suggèrent qu'il puisse être un noyau intégratif clé contrôlant les aspects moteurs et non-moteurs du comportement. Nous testerons cette hypothèse en activant les neurones du GPe dans un premier temps par les techniques classiques de l'optogénétique puis, dans un deuxième temps, par l'activation par ultrasons de l'implant miniaturisé placé dans le GPe. Les effets de la stimulation optogénétique du GPe seront testés chez des souris C57Bl6/J et des souris génétiquement

modifiées pour identifier les populations neuronales ciblées, en condition physiologique et pathophysiologique. Les effets de la photoillumination des neurones du GPe seront mesurés dans des tests comportementaux permettant de mettre en évidence les symptômes moteurs de la maladie de Parkinson et sur l'activité neuronale par des enregistrements de potentiels de champs locaux dans le GPe ou la SN réticulata (SNr). La pathologie de Parkinson sera induite chez l'animal à l'aide d'une neurotoxine spécifique des neurones catécholaminergiques, qui détruira progressivement les neurones dopaminergiques de la SNC. Cette opération sera réalisée sous anesthésie gazeuse générale après administration d'un analgésique opiacé puissant (Vetergesic 0.05 mg/kg, s.c.).

La règle des 3 Rs sera suivie de la manière suivante

- Remplacement Non applicable ici car la nature de notre étude ne permet pas d'envisager le remplacement sur des cultures de cellules et nécessite l'utilisation d'animaux et d'expériences *in vivo*.

- Raffinement L'analyse comportementale sera réalisée chez les animaux vigiles qui ne doivent pas être stressés pour ne pas compromettre leurs performances. Pour favoriser le bien-être et l'interaction sociale, les animaux seront hébergés de deux à quatre par cage, avec eau et nourriture à volonté. Ils auront à leur disposition de la litière foisonnante (diminuant le stress de l'animal et facilitant sa thermorégulation) ainsi que des bûchettes en peuplier et des tubes en PVC. Après une période d'habituation de deux semaines dans leur nouvel environnement (animalerie et congénères), ils seront manipulés par l'expérimentateur en charge de les familiariser aux expériences comportementales.

- Réduction Ce projet, d'une durée de cinq ans, nécessitera l'utilisation de 516 souris mâles et femelles adultes, réparties en plusieurs groupes (6 à 14/groupe en fonction du type d'expérience). Ce nombre est basé sur une approche statistique permettant de vérifier notre hypothèse à 80% de chances pour un seuil de significativité de 5%. Cependant, il pourra être réduit en fonction des résultats marquants obtenus dans les tests comportementaux et du nombre de dispositifs à tester. En effet, au vu de la difficulté technique du projet, nous pourrions être amenés à tester moins de prototypes qu'anticipés. En fonction de leur taille finale, ils pourront être implantés dans d'autres structures telles que le cortex moteur ou le striatum également impliquées dans le contrôle du mouvement. Ce projet de recherche devrait permettre une meilleure compréhension de la pathophysiologie de la maladie de Parkinson et permettre à terme de développer une technologie nouvelle pour traiter les troubles moteurs des patients parkinsoniens et probablement d'autres pathologies du système nerveux central.

15382 Le cerveau est un organe extrêmement complexe dont le fonctionnement fin est encore loin d'être compris. Les recherches sur le cerveau sont essentielles sur le plan fondamental, pour comprendre les processus cognitifs, de mémorisation, d'émotions, et sur le plan médical, pour mieux comprendre la physiopathologie des maladies neurodégénératives ou psychiatriques. On sait que ceux-ci siègent au moins en partie dans le cortex préfrontal et qu'ils sollicitent des processus cognitifs tels que l'attention sélective, la mémoire de travail, le traitement de séquences abstraites et la perception consciente. Notre projet vise à comprendre l'organisation des microcircuits neuronaux des régions impliquées, ainsi que les interactions dynamiques entre elles en utilisant des méthodes de pointe en électrophysiologie et bio-imagerie. Ces méthodes permettent d'acquérir des données sur les "corrélats neuronaux de la conscience", c'est-à-dire les changements neuronaux qui se produisent lorsque l'on prend conscience de quelque chose dans le monde extérieur.

Les activités cérébrales étudiées dans ce projet ne sont pas suffisamment bien comprises pour être reproduites *in silico*. Il est donc nécessaire de recourir à un modèle animal, ici le primate non humain (PNH). Le PNH est le modèle animal qui se prête le mieux à ces recherches grâce à ses similitudes génétiques et cérébrales très fortes avec l'Homme. De par ses capacités cognitives avancées, les PNHs peuvent être entraînés à réaliser des tâches cognitives complexes, qui sont spécifiquement affectées lors de maladies mentales comme la schizophrénie et l'autisme.

Pour les expériences électrophysiologiques, nous utiliserons de petits faisceaux de fils métalliques implanté de manière chronique dans le cerveau pour enregistrer directement des neurones. Des techniques similaires sont utilisées à très petite échelle chez des patients atteints d'épilepsie. Le principal avantage de cette technique est de visualiser l'activité globale de populations neuronales composées de centaines de neurones, et de pouvoir faire le lien avec le niveau anatomique de ceux-ci, en visualisant la forme et le type cellulaire des neurones. De nombreux tests chez l'animal sont nécessaires afin de s'assurer de l'innocuité de cette technique avant de pouvoir envisager un passage chez l'Homme. Les animaux seront soit impliqués dans des tâches comportementales actives, soit dans des expériences sous anesthésie générale afin de déterminer le rôle de la conscience dans le traitement cérébral de l'information sensorielle. Enfin, nous pourrons faire la comparaison entre les mécanismes neuronaux de la cognition du PNH et de l'homme grâce à des enregistrements par magnétoencéphalographie (MEG) chez des sujets sains.

Ce projet implique 21 animaux, tous issus d'un élevage agréé et dédié aux études scientifiques. Des expériences préliminaires, des tests statistiques, ainsi que l'étude de la littérature ont permis de réduire ce nombre au minimum nécessaire pour obtenir des résultats exploitables.

Le projet implique l'étude des fonctions cognitives supérieures, de ce fait les tâches comportementales sont difficiles et nécessitent que les animaux soient à l'aise et concentrés. Ces tâches sont conçues pour maintenir l'attention des animaux et satisfaire la curiosité de ces animaux intelligents. Tous les implants chirurgicaux sont chroniques et doivent avoir un effet très limité sur le bien-être des animaux afin qu'ils puissent travailler sur ces tâches difficiles. De plus, quand cela est possible, les animaux seront hébergés en groupe afin de conserver un contact social proche de celui de qu'ils ont dans la nature, et une large variété d'enrichissements auditifs, visuels, tactiles, et alimentaires sont mis à leur disposition, pour garder les animaux curieux et flexibles sur le plan cognitif. Finalement, l'état de santé des animaux sera contrôlé de manière régulière avec une attention particulière portée au bien-être animal, socialement et cognitivement, socialement et cognitivement. Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis et validés par un vétérinaire avant d'être réalisés par un médecin hospitalier spécialement formé. Les paramètres physiologiques (pouls, fréquence respiratoire, tension, etc.) seront suivis continuellement pendant les examens. Le modèle primate a un statut unique en neurosciences car il nous permet d'étudier précisément les corrélats neuronaux de fonctions cognitives supérieures, comme l'attention sélective, la mémoire de travail, le traitement de séquences abstraites et la perception consciente. Des études précédentes de notre laboratoire mettent en évidence le rôle du cortex préfrontal, ainsi que les aires sensorielles primaires.

L'étude de l'activité cérébrale sera réalisée sur des primates non-humains (PNH) soit impliqués dans des tâches comportementales actives, soit sous anesthésie générale afin de déterminer le rôle de la conscience dans le traitement cérébral de l'information sensorielle. Enfin, nous pouvons effectuer une comparaison de ces mécanismes neuronaux de la cognition entre PNH et humains grâce à des enregistrements par magnétoencéphalographie chez des sujets humains.

Le PNH est le modèle animal qui se prête le mieux à ces recherches grâce à ses similitudes génétiques et cérébrales très fortes avec l'homme. De par ses capacités cognitives avancées, les PNHs peuvent être entraînés à réaliser des tâches cognitives complexes qui sont affectées lors de maladies mentales comme la schizophrénie et l'autisme. Les singes macaques sont également le modèle le plus utilisé en neurosciences, ce qui permettra des comparaisons avec d'autres études dans le monde.

Ce projet implique 21 animaux, tous issus d'un élevage autorisé et dédié aux études scientifiques. Des expériences préliminaires, des tests statistiques, ainsi que l'étude de la littérature ont permis de réduire ce nombre au minimum nécessaire pour obtenir des résultats exploitables.

L'état de santé des animaux sera contrôlé de manière régulière avec une attention particulière portée au bien-être animal. Les méthodes expérimentales proposées ne présentent aucun danger pour l'animal grâce à des critères drastiques d'arrêt en cas de signes de souffrance qui ont été préalablement déterminés. Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis et validés par

un vétérinaire avant d'être réalisés par un médecin hospitalier spécialement formé. Les paramètres physiologiques seront suivis continuellement pendant les examens.

15383 L'épileptogénèse est l'ensemble d'évènements qui transforment un cerveau sain en épileptique. Il s'agit d'un processus graduel qui inclut une inflammation, une mort cellulaire et un remodelage aberrant des circuits neuronaux.

Lors de l'épileptogénèse des enzymes appelées MMP sont activées et remodelent l'environnement autour des neurones. Nous avons développé des peptides fluorescents (nommés ACPPs) capables de rentrer dans les neurones lorsque les enzymes MMP sont activées (par ex. pendant une crise épileptique).

Toutes les étapes de validation de ces outils ont été réalisées *in vitro* par des mesures de biochimie sur lignées cellulaires en culture (suivant la règle 3R "Remplacer"). Nous souhaitons maintenant utiliser ces peptides *in vivo* chez la souris dans un modèle d'épileptogénèse. Nous utiliserons une procédure qui prévoit l'injection intra-hippocampale de kainate chez la souris, qui permet de mimer les étapes de développement de l'épilepsie du lobe temporal retrouvée chez l'Homme. Les peptides ACPPs nous permettront de suivre le profil d'activation spatio-temporelle des métalloprotéases sécrétées. Nous allons étudier quelles cellules sont activées et à quel moment pendant les différentes étapes du processus épileptogénique.

Règle 3R "Réduire" : nous réduirons le nombre d'animaux utilisés grâce à une approche rationnelle. Cinq animaux seront utilisés pour chaque condition. Nous estimons à 63 souris le nombre total de souris utilisées sur 1 ans.

Règle 3R "Raffiner" : Les animaux seront hébergés par groupes de 5 maximum. L'état de santé des animaux sera suivi quotidiennement par les expérimentateurs et évalué grâce à une grille codifiant le niveau de bien-être. Tout problème de santé sera adressé au plus vite. Si des complications devaient survenir et un animal montrait des signes de détresse, souffrance, prostration, un arrêt d'alimentation, poil ébouriffé ou une perte >15% de son poids corporel (pesée effectuée une fois/semaine, en plus d'une observation visuelle quotidienne), il sera sacrifié par inhalation d'isoflurane suivie par décapitation.

15384 La section unilatérale du nerf vestibulaire (NVU) engendre un syndrome vestibulaire bien connu chez l'Homme et l'animal qui comprend des désordres posturo-locomoteurs, oculomoteurs et cognitifs dont l'expression diminue progressivement avec le temps. A un stade avancé de la compensation, les animaux vestibulo-lésés présentent une asymétrie posturale qui se traduit par une augmentation durable de la répartition du poids de l'animal sur les pattes avant et arrière du côté de la lésion (pattes gauche). Cette stratégie posturale semble constituer une réponse adaptative à l'instabilité posturale. L'importance de l'expérience sensorielle dans la plasticité des cartes corticales somesthésiques est bien établie et les changements de pression sur les surfaces plantaires qu'elle génère, en modifiant ainsi les feed-back somesthésiques régulateurs de la motricité pourrait modifier les propriétés d'organisation des cartes cutanées. L'objectif de ce projet est d'éprouver cette hypothèse.

Cette étude comporte un aspect fondamental lié aux remodelages corticaux consécutifs à une lésion vestibulaire périphérique et à leurs corrélats fonctionnels. Le second aspect de l'étude est translationnel en France, les déficits vestibulaires représentent 5% des urgences à l'hôpital et 300 000 consultations par semaine. La perte de l'équilibre constitue un vrai handicap sensoriel et les déficits vestibulaires impactent grandement la vie quotidienne des patients. Les mécanismes neurobiologiques qui sous-tendent la compensation vestibulaire restent en partie méconnus. Une meilleure compréhension du rôle des informations somesthésiques dans ce processus et plus généralement de la plasticité corticale mise en jeu pourrait permettre d'ouvrir la voie à des avancées dans les stratégies de réhabilitation fonctionnelle des patients vestibulo-déficients.

Dans cette optique, nous effectuerons des cartographies électrophysiologiques dans la couche IV du cortex somesthésique primaire, 1 heure et 1 mois après la lésion vestibulaire parallèlement à l'évaluation comportementale de la compensation vestibulaire chez le rat. Des analyses

immunohistochimiques nous permettront également d'étudier les mécanismes neurochimiques sous-jacents aux remodelages corticaux. Nous estimons à 50 le nombre d'animaux nécessaires pour répondre aux objectifs expérimentaux de notre étude. Afin de répondre de manière optimale à la règle des 3R voici nos justifications. Remplacement des objectifs même de cette étude, axés sur la compréhension des mécanismes de plasticité mis en jeu après une lésion vestibulaire unilatérale et leur corrélation avec la récupération fonctionnelle nécessitent le recours à des animaux. En effet, nos questionnements impliquent des approches invasives *in vivo* qui permettent une résolution spatiale et temporelle des changements corticaux qui ne peuvent être obtenues par une exploration fonctionnelle chez l'homme, ni par des méthodes *in vitro* ou *in silico*. Par ailleurs, l'étude des mécanismes neurochimiques nécessite une approche post mortem sur coupes histologiques. Réduction le nombre de rats par groupe expérimental est limité à son strict minimum compte tenu du nombre d'animaux utilisés dans des études précédentes de la littérature et des contraintes de chaque technique expérimentale. Raffinement une médication adaptée (anesthésiques, analgésiques) sera mise en œuvre pour éviter toute douleur ou souffrance des animaux. En ce qui concerne les conditions d'hébergement, et selon les nouvelles directives européennes, en plus d'un accès libre à l'eau de boisson et à la nourriture, nous avons rajouté dans les cages de la litière à base de frisure de papier qui sera renouvelée lors de chaque change.

15385 Il est maintenant bien établi qu'il existe une formation de nouveaux neurones tout au long de la vie dans l'hippocampe des mammifères (y compris l'homme), et que ce phénomène joue un rôle dans la mémoire spatiale. L'hippocampe est une structure clé impliquée dans les processus mnésiques. Les nouveaux neurones nés à l'âge adulte s'intègrent aux réseaux des neurones formés au cours du développement. Ces nouveaux neurones, appelés néo-neurones, sont cruciaux pour l'apprentissage et la mémoire. Par le passé, nous avons montré qu'ils sont impliqués dans le vieillissement des fonctions mnésiques. De plus, des études réalisées sur le rat mâle adulte (non sénéscent) ont montré qu'un apprentissage spatial dans un labyrinthe aquatique (LA) entraîne une complexification de l'arborisation dendritique des néo-neurones. Ceci suggère un effet spécifique de l'apprentissage spatial sur ces néo-neurones qui pourrait être lié à l'existence d'une connectivité neuronale augmentée. En d'autres termes, suite à l'apprentissage spatial dans le labyrinthe aquatique, les néo-neurones recevraient plus d'informations de la part des structures qui les contactent (afférences). L'objectif de ce projet est de tester l'hypothèse qu'au cours du vieillissement, chez certains individus, les néo-neurones reçoivent moins de connexions en provenance de leurs afférences et que ce phénomène serait à l'origine de déficits mnésiques. En conséquence, l'activation des néo-neurones chez l'animal vieillissant, via un apprentissage spatial en labyrinthe aquatique, devrait suppléer cette diminution de connectivité des afférences et améliorer les fonctions mnésiques. Pour tester cette hypothèse, nous proposons de marquer les neurones nés à différents temps de la vie adulte (début, au milieu et fin de la vie) par l'utilisation d'outils moléculaires et de regarder leur connectivité en condition basale ou suite à un apprentissage spatial à différents temps (milieu ou fin de vie).

Pour cela, des rats mâles de la souche Sprague-Dawley (n=960) seront utilisés à différents stades de développement (jeunes adultes, en milieu de vie, et sénéscents). Ils seront soumis à une première procédure chirurgicale permettant de marquer les neurones d'intérêt, puis à deux procédures comportementales non invasives permettant de mesurer leurs rythmes circadiens ainsi que leurs capacités mnésiques dans un labyrinthe. Enfin une seconde chirurgie permettra d'analyser les connexions effectuées par les neurones marqués lors de la première chirurgie, et d'étudier l'impact de l'apprentissage dans le labyrinthe sur ces connexions. Tout sera mis en œuvre afin de réaliser ce projet tout en respectant la règle des 3R. En ce qui concerne le remplacement, il est important de noter que cette étude nécessite d'une part la visualisation et l'intégrité d'un réseau englobant différentes régions du cerveau, et d'autre part qu'il repose sur une approche intégrée nécessitant de mesurer les capacités cognitives de l'animal au cours du vieillissement. Un tel travail ne pourrait être effectué par une approche *in vitro*, ou *in silico*. Dans un souci de respect du R de réduire, nous avons calculé au plus juste le nombre d'animaux par groupe sur la base d'études préalablement menées au sein du laboratoire. Ce nombre minimal nécessaire pour faire des analyses statistiques cohérentes tient compte de la nécessité d'avoir une cohorte suffisante

d'animaux à des stades de vie avancés (jusqu'à 22 mois). Enfin, pour limiter au maximum l'inconfort des animaux, nous avons développé des procédures de raffinement notamment par l'utilisation d'anesthésies générales et locales et par l'usage d'analgésiques pour pallier la douleur associée aux opérations chirurgicales ainsi que par la surveillance et l'observation quotidienne des animaux afin de s'assurer de leur bien-être. De plus, pour identifier les dommages et contraintes subis par l'animal, nous avons défini une grille de score du bien-être basée sur quatre critères. Ces critères sont la variation du poids de l'animal, son apparence physique, les changements comportementaux non provoqués et la réponse à des stimuli environnementaux. En cas de mise en danger du bien-être établie à partir de ces critères, des procédures d'intervention ont été mises en place et des points limites ont été définis en accord avec la vétérinaire responsable.

15386 Le DU de microchirurgie a pour but de former des étudiants à la suture vasculaire sous microscope opératoire sur le modèle rongeur. Ce DU s'adresse aux étudiants issus de 5 spécialités (chirurgie plastique, chirurgie maxillo-faciale, chirurgie ORL, chirurgie orthopédique et neurochirurgie) et sera composé de 7 exposés théoriques de toutes les spécialités impliquées et de 9 séances de travaux pratiques (TP), dont 20h d'expérimentation animale.

L'intitulé des TP est détaillé ci-dessous

TP « Shirataki, dissection du rat et suture de l'aorte 8/0 »

TP « Shirataki Suture de l'aorte 9/0 »

TP « Shirataki, Suture de la veine cave 9/0 »

TP « Suture de l'aorte 10/0 + Suture de la veine cave 10/0 »

TP « Suture de la carotide 10/0 »

TP « Suture de l'artère rénale 11/0 + Suture de la veine rénale 11/0 »

TP « Suture de l'artère rénale 11/0 + Suture de la veine rénale 11/0 »

TP « Suture de la carotide 11/0 + Fistule jugulo-carotidienne 11/0 »

TP « Séance de révision »

Le DU sera précédé d'un cours magistral visant à introduire les principes de l'expérimentation animale, à sensibiliser les étudiants aux bonnes pratiques, au bien-être animal, à l'éthique et à la réglementation. La première séance de travaux pratiques sera réalisée sur des rats en plastique pour mieux appréhender les gestes.

Les travaux pratiques, dirigés par deux enseignants se déroulent dans une salle de TP dédié et équipée de microscopes. Ils ont pour but de s'exercer à la suture vasculaire à l'aide de fils de taille décroissante au fur et à mesure de la diminution de la taille des vaisseaux. Les fils vont du 8/0 au 11/0. Les sutures sont faites sur des rats anesthésiés par un mélange de kétamine/xylazine.

Conformité/exigences de remplacement, de réduction et de raffinement

Le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum tout en permettant la réalisation des actes de microchirurgie par les étudiants. L'utilisation de rats en plastique est prévue pour la première séance de TP afin de familiariser l'étudiant avec le microscope et le matériel nécessaire aux microanastomoses, sans recourir à un animal. Les premières séances débiteront par la réalisation de points de suture au microscope sur un aliment permettant de réaliser les gestes à acquérir (Shirataki 8/0).

Pendant toute la période précédant la mise en oeuvre du projet, les animaux seront hébergés en groupe sociaux et recevront un enrichissement adapté. Les procédures seront sans réveil et dans lesquelles les animaux seront sous anesthésie générale et analgésiques (analgésiques centraux).

Le nombre total d'animaux utilisés dans le projet sera de 540 rats maximum sur une durée de 5 ans.

15387 Il existe plus de 200 maladies neuromusculaires différentes tant par la gravité de l'atteinte musculaire que par ces conséquences sur l'organisme. Notre axe de recherche cible les maladies génétiques rares qui touchent les muscles dont les myopathies font partie. Ces maladies

neuromusculaires entraînant une dégénérescence et une nécrose du tissu musculaire réduisant drastiquement l'espérance de vie. La myopathie de Duchenne, par exemple, touche environ 2 500 personnes en France et 18 600 en Europe.

Une étude antérieure en collaboration avec notre équipe a montré en 2018 une preuve de concept selon laquelle le tamoxifène, un médicament approuvé et validé pour traiter le cancer du sein, pourrait être réutilisé pour traiter une forme sévère de myopathie, la myopathie myotubulaire. Nous souhaitons valider son efficacité sur d'autres myopathies centronucléaires. Cette thérapie serait la plus rapide à appliquer aux patients, afin d'améliorer leur survie et leur autonomie.

Nous avons dans un premier temps étudié des modèles cellulaires puis des modèles animaux (souris). Désormais, nous souhaitons planifier un projet qui vise à mieux comprendre la maladie et à valider les propriétés d'une molécule à fort potentiel thérapeutique. Pour ces travaux il est nécessaire d'utiliser la souris, indispensable pour étudier d'une part la physiopathologie et d'autre part l'amélioration des symptômes. Nous souhaitons utiliser une molécule non toxique et qui est déjà utilisée chez l'homme et qui a déjà montré des améliorations spectaculaires dans une précédente étude. Par cette étude nous envisageons d'évaluer les conséquences fonctionnelles et thérapeutiques de l'administration chronique de tamoxifène sur la maladie, dans des nouveaux modèles de souris myopathes dont les mutations génétiques reproduisent fidèlement les symptômes musculaires de patients atteints de myopathies centronucléaires.

Des études cellulaires sont prévues afin de réduire au maximum le nombre d'animaux. En revanche, seul le modèle animal permet d'étudier d'une part la physiopathologie et d'autre part l'amélioration des symptômes (REMPACEMENT).

Afin de réduire le nombre d'animaux nécessaire à l'étude, plusieurs procédures expérimentales seront réalisées avec un maximum d'un test par jour. Le nombre d'animaux sera réduit au maximum pour obtenir une puissance statistique suffisante pour déterminer si le traitement est efficace. Ainsi nous pouvons avancer que 10 souris au maximum par groupe seront nécessaires pour conclure sur le projet (REDUCTION).

Les myopathies sont des maladies qui affectent les muscles pouvant entraîner des difficultés pour se déplacer, de la nourriture sera placée dans la cage. Afin de s'assurer que les animaux ne souffrent pas, ils seront surveillés quotidiennement. Tout signe de douleur sera pris en charge en prenant les mesures appropriées en fonction du niveau de douleur observé (soit un analgésique sera administré, soit les animaux seront euthanasiés prématurément si nécessaire) (RAFFINEMENT). Pour cette étude, 184 souris seront nécessaires.

15388 Contexte scientifique

Les maladies cardiovasculaires représentent la première cause de décès dans le monde. Malgré les progrès récents et la mise en place de stratégies thérapeutiques visant à diminuer le mauvais cholestérol dans le sang, plus de 17 millions de patients décèdent de pathologies cardiovasculaires chaque année. Récemment, l'inflammation est apparue comme une composante centrale contribuant au développement des maladies cardiovasculaires mais les mécanismes qui régissent cette inflammation restent inconnus. Ce projet vise à identifier et valider de nouvelles voies métaboliques, et notamment le rôle de l'enzyme glutaminase 2 (Gls2), qui contribuent à l'inflammation et au développement des plaques d'athérosclérose liés aux maladies cardiovasculaires.

Problématique

Une corrélation inverse a été observée entre la survenue d'événements cardiovasculaires et le taux de certains acides aminés plasmatiques. En particulier, des études génétiques ont montré que l'enzyme glutaminase (Gls2) présente principalement dans le foie pourrait contribuer à ces régulations. Nous nous intéressons donc à cette enzyme dans le développement des plaques d'athérosclérose et la survenue des maladies cardiovasculaires.

Hypothèse de travail : Notre projet vise à enlever de manière sélective l'enzyme Gls2 hépatique et regarder les conséquences au niveau du foie et des vaisseaux, notamment dans des modèles

précliniques d'athérosclérose. Nous utiliserons des modèles précliniques de pathologies cardiovasculaires bien définis et validés par la communauté scientifique.

Justification du modèle et raffinement : En condition physiologique les souris sont naturellement protégées contre l'athérosclérose. Afin d'étudier cette pathologie nous devons donc induire la mutation ApoE dans nos souris d'intérêts. Nous avons choisi ce modèle de souris car c'est un modèle standard, bien reconnu dans le domaine scientifique pour l'investigation de manipulations génétiques liées aux maladies cardiaques. Toutefois, toutes les procédures menées avec ce modèle seront interrompues avant l'apparition de signes cliniques douloureux pour les animaux. De plus, des mesures de réduction et de raffinement sont prévues afin de limiter la sévérité des procédures.

Les 3R : Remplacement Les maladies cardiovasculaires sont des pathologies complexes dans lesquelles de multiples voies métaboliques et physiologiques interviennent. De ce fait, une approche *in vivo* reproduisant ces interactions nous est indispensable pour répondre à notre problématique. De plus, l'étude du dépôt de cholestérol dans les artères ne peut être réalisé *in vitro*. Des modèles murins capables de développer de l'athérosclérose ont donc été développés et validés par la communauté scientifique comme outils d'études précliniques.

Réduction Notre approche statistique garantit l'obtention de résultats exploitables avec le plus petit nombre d'animaux possible. Dans le cadre de cette étude, et pour chaque groupe, nous utiliserons des souris mâles et femelles. Ceci permettra d'utiliser l'ensemble des animaux génères dans les élevages. Les résultats pourront donc être appliqués à la fois aux hommes et aux femmes. Ce projet prévoit l'utilisation de 864 souris sur 4 ans.

Raffinement La mise en place de points limites précoces, prédictifs et adaptés à chaque procédure, basés sur une observation détaillée des animaux au cours de chaque procédure permettront de limiter la sévérité de celles-ci. Les souris seront de plus hébergées en groupe (6 souris par cage) dans des cages enrichies (igloos, ouate, baguettes de bois à ronger).

Perspectives : Cette étude pourrait ouvrir de nouvelles perspectives de traitement visant à mieux contrôler moduler le ratio de glutamine/glutamate plasmatique dans les maladies cardiovasculaires et freiner leur développement. Afin de pouvoir conclure sur l'importance de cette voie métabolique nous avons calculé (test de significativité statistique) que 864 souris devraient être utilisées et réparties sur une période de 4 ans. L'ensemble des procédures proposées dans ce projet sont connues comme non remplaçables, par des procédures ne faisant pas intervenir directement l'animal.

15389 La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative caractérisée par la perte des neurones produisant de la dopamine situés dans une région du cerveau appelée la substance noire. La dopamine est un neurotransmetteur essentiel pour le contrôle des mouvements volontaires et les apprentissages. Le traitement de la maladie de Parkinson est basé sur l'utilisation d'agonistes dopaminergiques qui ont pour but de pallier au manque de dopamine consécutif à la perte des neurones dopaminergiques. Ce traitement entraîne des effets secondaires appelés troubles du contrôle des impulsions (TCI) qui se manifestent par des addictions comportementales telles que jeu pathologique, achats compulsifs ou consommation compulsive de nourriture. Les mécanismes responsables de ces effets secondaires sont mal connus cependant plusieurs études d'imagerie cérébrale indiquent une implication de régions commandant les fonctions exécutives (cortex, striatum). Plusieurs études cliniques démontrent que les patients souffrant de TCI présentent un profil cognitif altéré. Actuellement, aucun modèle animal de TCI n'a été développé malgré le fait que ces effets secondaires non moteurs affectent 30% des patients sous traitement. Ce projet permettra de réaliser un suivi longitudinal d'animaux (modèle rat) sur différents aspects cognitifs (apprentissage, compulsivité, persévérance) en utilisant des tests comportementaux avant et après lésion dopaminergique et prise de traitement antiparkinsonien, ce qui devrait permettre de générer un modèle animal de TCI et d'identifier des facteurs de vulnérabilité individuelle. Le projet permettra également d'identifier des marqueurs prédictifs du développement de la maladie et d'étudier la communication neuronale entre deux structures cérébrales impliquées dans la cognition.

Ce projet nécessitera 160 animaux maximum et sera réalisé suivant la règle des 3R. Remplacer ces approches nécessitant une analyse comportementale, il n'est pas envisageable d'utiliser des méthodes alternatives à l'expérimentation animale. Réduire un protocole rigoureux a été envisagé avant toute expérimentation permettant de réduire au maximum le nombre d'animaux (analyse de puissance permettant de générer des groupes de 20 animaux, sachant que 8 conditions expérimentales sont nécessaires) en ne planifiant que les expérimentations nécessaires et en mettant en place un suivi longitudinal où chaque animal est son propre contrôle (mesures répétées permettant des analyses statistiques plus performantes). De plus, les animaux seront inclus dans plusieurs études (comportementale, identification de marqueurs prédictifs et communication neuronale). Raffiner les expérimentations minimisent au maximum l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'angoisse des animaux au cours des différentes procédures de ce projet (médicamentation anesthésie + analgésie pour les procédures chirurgicales définie avec un vétérinaire et tests comportementaux ne nécessitant pas d'intervention directe de l'expérimentateur).

15390 Dans ce projet, nous voulons étudier l'impact de différents types de stimulations environnementales procurées dans le cadre d'un enrichissement environnemental sur l'addiction aux drogues. En effet, l'enrichissement environnemental chez le rongeur, consiste à mettre à disposition des animaux une stimulation sociale, une stimulation physique et une stimulation cognitive. Néanmoins, les systèmes d'enrichissement conventionnels ne permettent pas de déterminer si et combien les animaux interagissent avec leur environnement et les conséquences de ces interactions sur leur comportement vis-à-vis de la drogue. Ici, nous utiliserons un nouvel équipement permettant l'hébergement, en groupe, d'animaux (jusqu'à 18) dans un environnement enrichi et semi-naturel et de suivre leur position dans la cage pendant plusieurs jours, 24h/24h, grâce à des puces individuelles qui émettent un signal radio (rf-ID ou radio frequency identity). Grâce à la position des rats dans cet équipement, nous pourrons reconstruire de manière précise leur interaction avec les congénères (temps passé en groupe ou isolé) et avec l'environnement (ex. temps passé à faire de l'exercice physique et cognitif) et de mesurer leur performance. Ainsi, nous pourrons établir d'un point de vue quantitatif et qualitatif la relation entre les interactions avec l'environnement enrichi et l'addiction aux drogues.

Nous voulons examiner 2 grandes questions 1) la vulnérabilité à développer une addiction et 2) la capacité de l'environnement de soigner l'addiction une fois développée. Ainsi, nous aurons 2 expériences. Dans l'expérience 1, les animaux implantés avec une puce rf-ID (procédure 1) seront hébergés dans l'environnement enrichi interactif (procédure 2) avant la chirurgie de cathétérisation jugulaire (procédure 3) et d'auto-administration intraveineuse (procédure 4). Dans cette expérience, nous étudierons si le comportement dans le milieu semi-naturel en terme d'interaction sociale, exercice physique et exercice cognitif avant toute exposition à la drogue peuvent prédire le développement d'une prise compulsive de drogue. Dans l'expérience 2, les animaux implantés avec une puce rf-ID (procédure 1) subiront la chirurgie de cathétérisation jugulaire (procédure 3) et pourront faire de l'auto-administration intraveineuse de drogue (procédure 4) et seront ensuite hébergés dans l'environnement enrichi (procédure 2) pendant une période d'abstinence. Dans cette expérience, nous étudierons si la prise de drogue altère le comportement dans le milieu semi-naturel et si la quantité et la qualité des interactions sociales, de l'exercice physique et de l'exercice cognitif après la prise de drogue peuvent prédire le taux de rechute à l'addiction.

Dans ce projet, nous avons pris en considération la règle des 3Rs (remplacer, réduire et raffiner). Ce type de recherche, visant à comprendre les bases du comportement normal et/ou pathologique, peut uniquement être mené sur un animal vivant (remplacer). Dans ce projet, nous allons mesurer dans le même individu le comportement social, l'exercice physique et l'exercice cognitif. Dans les expériences conventionnelles, ces comportements sont étudiés séparément ce qui multiplie le nombre d'animaux utilisés. Ainsi, nous pourrons diminuer considérablement le nombre d'animaux utilisés dans ce type d'expérience. Nous utiliserons des méthodes statistiques appropriées de type ANOVA qui nous permettront de faire des comparaisons multiples et de limiter le nombre d'animaux utilisés (réduire). Pour réduire la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux la chirurgie d'implantation des puces rf-ID sera réalisée sous anesthésie générale. De plus, les animaux seront

hébergés en groupes de 18 dans un environnement enrichi ce qui correspond à une situation plus similaire aux conditions de vie naturelle des rongeurs et est considéré une amélioration des conditions d'hébergement (raffiner). Dans ce projet nous allons utiliser 720 rats. Cette recherche est innovante et a le potentiel de fournir des informations critiques pour la compréhension des déficits sociaux associés aux maladies psychiatriques.

15391 Le syndrome myasthénique congénital (SMC) est une maladie rare d'origine génétique, retrouvée chez 1 personne sur 250 000. Les patients présentent divers symptômes en fonction du gène retrouvé muté. Un peu plus d'une trentaine de gènes ont été identifiés comme pouvant être liés au SMC CHAT, COLQ, CHRNA1, CHRNB1, CHRND, CHRNE, RAPSN, MUSK, DOK7, SCN4A, ... Les protéines codées par ces gènes interviennent dans le bon fonctionnement des muscles en permettant la transmission de l'information nerveuse vers les muscles.

Ainsi, en cas de SMC, les patients présentent une faiblesse musculaire et une fatigue importante lors d'efforts physiques. La faiblesse musculaire entraîne des symptômes au niveau des yeux avec une faiblesse des muscles des paupières (induisant des infections oculaires et des difficultés de vision), une paralysie plus ou moins importantes des muscles des yeux, du larynx et des muscles nécessaires à la mastication et la déglutition. Dans la majorité des cas, les patients atteints de SMC présentent également des difficultés respiratoires.

Pour le moment, il n'existe pas de traitement curatif pour le SMC mais des traitements pouvant uniquement favoriser la contraction des muscles.

Parmi ces SMC, nous allons nous intéresser aux SMC associés à des mutations du gène COLQ (collagène Q). Ces SMC sont principalement associés à un déficit en acétylcholinestérase (AChE) une enzyme impliquée dans la transmission de l'influx nerveux aux muscle. Ce déficit est responsable de faiblesse musculaire sévère, de fatigue et de scoliose importante (une déviation permanente de la colonne vertébrale) chez les patients. Le but du projet est de concevoir une thérapie génique pour traiter le SMC lié à COLQ.

Nous allons utiliser le modèle murin ColQDex2/Dex2 : ce modèle reproduit plusieurs symptômes du SMC lié à COLQ. Grâce à l'aide de vecteur de type AAV (dérivés de virus associés à l'adénovirus), nous allons introduire le gène humain COLQ dans le modèle murin par voie intraveineuse afin de restaurer le niveau de collagène Q aux seins des différents tissus.

En tenant compte du bien-être des animaux, nous avons conçu les procédures expérimentales en respectant les 3R.

Remplacement il n'existe pas de moyen de remplacer l'utilisation d'animaux pour l'étude de cette pathologie, car bien que des modèles cellulaires présentant une inactivation du gène COLQ existent, ils ne permettent pas d'étudier certains défauts fonctionnels majeurs de la pathologie. Le modèle murin utilisé ici présente une espérance de vie réduite avec la manifestation des premiers symptômes avant le sevrage. Les souris présentent alors une faiblesse musculaire, une réduction du poids corporel et la présence d'une scoliose dès l'âge de 4 semaines. De plus, l'activité de l'AChE est absente dès le sevrage. Nous pourrions donc suivre l'évolution de la maladie suite aux approches que nous souhaitons tester.

Réduction Certaines souris issues des croisements mais ne présentant pas de pathologie seront utilisées pour les croisements nécessaires au maintien de la lignée. La maladie affecte indifféremment les hommes et les femmes des souris des deux sexes seront donc utilisées. Afin de limiter le nombre d'animaux, le nombre de souris nécessaire a été estimé à 6 souris par groupe pour la PE 2 et à 11 souris par groupe pour la PE 3 par une étude statistique prédictive (test non paramétrique de comparaison de moyenne).

Raffinement les souris seront surveillées par observations de l'état général et pesée a raison de 2 fois par semaine, afin de détecter toute dégradation de l'état général de l'animal. Des soins seront administrés (désinfection locale (vétédine) et pansements de plaies cutanées et oculaires si nécessaire (biafine), la fréquence de surveillance des animaux sera augmentée et l'animal sera euthanasiée en absence d'amélioration de l'état général. La douleur générée par les injections intraveineuses est légère. Pour les animaux malades présentant un défaut de motricité, un aliment

spécifique hydratant et nourrissant sera placé au sol de la cage afin de leur faciliter l'accès. Lors des analyses qui permettront de vérifier que nos traitements améliorent la fonction du muscle, l'animal recevra une injection d'analgésique de type morphinique ce qui permettra de soulager les douleurs intenses éventuelles. L'animal sera également disposé sur un tapis chauffant tout au long de l'anesthésie lors de ces mesures.

Notre projet durera 3 ans et nécessitera l'utilisation totale de 216 souris.

15392 1 – Contexte scientifique, médical et sociétal : Les maladies neuropsychiatriques ont souvent des conséquences dévastatrices pour les patients, altérant leur santé ainsi que leur capacité à apprendre et à travailler. Notre capacité actuelle à traiter les troubles du système nerveux central est tragiquement limitée. Ces troubles font souvent intervenir un dysfonctionnement de la structure responsable de la transmission de l'information nerveuse entre deux neurones la synapse. Au cours des dernières années, des mutations génétiques altérant la formation et le fonctionnement des synapses ont été impliqués dans la pathogénie de maladies aussi diverses que le retard mental, la maladie d'Alzheimer ou la schizophrénie, ce qui a conduit au concept de "synaptopathies". Ce projet aborde des questions neurobiologiques fondamentales (mécanismes de formation et de plasticité des synapses, différenciation neuronale, formation des circuits neuronaux) qui sont pertinentes pour comprendre comment le cerveau est construit et fonctionne, et qui pourraient également être altérées dans des conditions pathologiques, notamment dans les synaptopathies.

2- Objectifs : Ce projet de recherche fondamentale s'inscrit dans le cadre de l'étude d'un gène (gène 1). Le gène 1 produit un facteur sécrété par les neurones, qui se concentre aux synapses et qui joue un rôle dans la formation et la plasticité synaptique chez la souris. Le gène 1 est également exprimé dans le cerveau humain et pourrait constituer un gène de susceptibilité de la schizophrénie. Le gène 1 est décrit pour interagir avec d'autres gènes (gènes 2, 3 et 4). Ce projet a pour objectif de rechercher si ces autres gènes (gènes 2, 3 et 4) coordonnent la formation des synapses avec le gène 1, et comment ils pourraient affecter les synaptopathies. Ce projet a été validé par un financement européen ERC.

3- Balance dommage – bénéfique : Notre finalité est d'expliquer la fonction des gènes 2, 3 et 4 dans le cerveau humain sain et pathologique, ce qui n'est pas possible de tester directement. Ce projet a démarré par la caractérisation d'un modèle invertébré et des expériences de culture cellulaire *in vitro*. Cependant les altérations de la formation et de la fonction des synapses ne peuvent pas être testées pleinement par des approches *in vitro*. Le recours à l'expérimentation animale est donc nécessaire pour étudier les altérations des gènes 2, 3 et 4 dans le contexte d'un cerveau entier. L'inactivation de ces gènes devra être conditionnelle et être spécifique de certaines populations neuronales. Ainsi la souris est le modèle de choix pour ce projet (1) son cerveau présente une organisation anatomique complexe, très bien décrite et proche de l'humain (2) son génome est à 98% identique à celui de l'homme (3) c'est le seul modèle dans lequel le système d'inactivation de gène conditionnelle Cre/Lox est établi.

Ce projet, constitué d'une procédure unique, sera réalisé sur 4 lignées de souris portant une mutation permettant l'inactivation conditionnelle du gène 2, 3 ou 4, ou la surexpression du gène 3. Le but est de réaliser des injections cérébrales intra-ventriculaires de vecteurs viraux chez les nouveaux-nés pour induire des mutations des gènes 2, 3 et 4 dans des populations sélectionnées de cellules cérébrales. Les injections intraventriculaires sont des procédures standard. Il s'agit de procédures brèves et les souris se rétablissent complètement, sans dommage ni souffrance durables. Cette procédure réalisée à P0 présente l'avantage d'éviter de réaliser une chirurgie puisqu'à P0 le crâne n'est pas encore complètement formé, il est encore mou. On peut donc réaliser une injection au travers de ce dernier sans chirurgie. Après un temps de survie approprié pour permettre une expression adéquate des protéines codées par le virus, les souris sont mises à mort par perfusion et le tissu cérébral d'intérêt est prélevé et utilisé pour analyser la morphologie des neurones, les connexions synaptiques et certains marqueurs biochimiques.

Le nombre total de souris sera de 128 pour 5 ans.

4- Règle 3R

Une attention particulière sera accordée à la règle des 3R afin de réduire le nombre d'animaux nécessaires tout en s'assurant de la reproductibilité des résultats. Le recours à l'expérimentation animale est nécessaire pour valider l'impact des mutations des gènes 2, 3 et 4 sur la formation et la fonction des synapses dans le cerveau entier. Ces méthodes sont complémentaires d'expérimentations sur des cellules en culture qui sont largement utilisées en parallèle pour cette étude. Afin de réduire le nombre d'animaux, nous réaliserons sur chaque animaux plusieurs marquages histologiques différents. Comme l'injection est une procédure invasive, les souris sont contrôlées régulièrement dans leur cage d'origine et toute manipulation susceptible d'entraîner du stress sera réalisée par un expérimentateur formé aux techniques de chirurgie, de contention et de manipulation des animaux. Les injections intraventriculaires sont des procédures standard, très brèves et qui n'induisent ni dommage ni souffrance durables. Enfin, la perfusion terminale lors de la collecte des tissus est réalisée sous une anesthésie profonde. Il est important de noter qu'en cas d'atteinte d'un point limite, les animaux seront mis à mort dans le respect de la réglementation et avec l'accord du responsable du bien-être animal de ce projet.

15393 Les récepteurs des facteurs de croissance des fibroblastes (FGFRs) sont des protéines fortement exprimées dans l'os et le cartilage, des mutations localisées dans les gènes FGFRs sont responsables de plusieurs pathologies osseuses rares (chondrodysplasies et craniosténoses) dont la fréquence est de 1/15 000 naissances. Afin d'étudier le rôle de ces gènes dans le squelette et certains tissus (cœur, peau, poumon, intestin, cerveau.) nous avons généré différents modèles murins et poissons.

Nous avons comme projet d'étudier d'une part ces différents modèles murins au cours du développement. En période prénatale (E16.5, E18.5), nous utiliserons les os longs, les côtes et la voûte crânienne pour faire des cultures d'organes ou bien des cellules isolées des côtes. En période postnatale (P1, P21, 6, 12 et 18 mois) nous analyserons le squelette en post-mortem. D'autre part, nous étudierons plusieurs approches thérapeutiques pour ces pathologies. Il s'agira d'injecter en sous cutanée différentes molécules (anticorps, inhibiteurs etc.) afin d'obtenir la preuve de concept qu'une molécule, médicament candidat, est efficace.

D'autre part, grâce aux différents modèles de poisson zèbre FGFR3 nous étudierons le développement du squelette cranio-facial pour comprendre le rôle de FGFR3 au cours de l'ossification membranaire. Nous étudierons des lignées de poissons zèbres, soit invalidées pour FGFR3 soit présentant des mutations gain de fonction. Le développement de la voûte crânienne sera étudié notamment par imagerie sur ces modèles.

La règle des 3R sera respectée dans ce projet

Remplacement les molécules seront testées *in vitro* dans des cellules pour évaluer leur toxicité, leur spécificité. Les molécules seront également testées sur des cultures d'organes (post-mortem) afin d'estimer leur efficacité sur la croissance osseuse.

Notre objectif étant de comprendre la physiopathologie des ostéochondrodysplasies et d'identifier des molécules susceptibles de corriger un défaut de croissance, seuls les modèles animaux peuvent apporter des réponses à nos hypothèses de travail.

Les études *in vitro* ne peuvent pas rendre compte complètement de la complexité de ce processus.

Raffinement La totalité des procédures effectuées sur poissons vivants seront faites sous anesthésie générale. Les points limites ont été envisagés. Un suivi quotidien des animaux sera réalisé. En cas de dépassement des points limites, les animaux seront sacrifiés.

Nous veillerons à fournir un enrichissement adapté à chaque espèce (coton, maisonnette, bâtonnets et nourriture gélatinée pour les souris et nourriture vivante pour les poissons). Nous veillerons également à fournir un enrichissement social.

Réduction : Nous générerons uniquement le nombre d'animaux nécessaire à la validité statistique des résultats.

Dans ce projet nous utiliserons 8676 animaux dont 3700 souris et 4976 poissons zèbres sur une durée de 5 ans.

Conclusion L'ensemble de ce projet permettra de comprendre le rôle des FGFRs au cours de la formation du squelette pour permettre ensuite de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques chez l'Homme.

15394 Le Dysfonctionnement de la pars intermedia de l'hypophyse (anciennement « maladie de Cushing ») est une maladie neurodégénérative liée au vieillissement, très prévalente au sein de la population équine, dont la moyenne d'âge augmente de plus en plus. Les chevaux de 15 ans et plus sont touchés.

L'hyperplasie fonctionnelle de la pars intermedia occasionne la surproduction d'hormones dont l'ACTH qui stimule la production de cortisol endogène. Cette imprégnation cortisolique a des effets immunosuppresseurs. De plus, l'immunosénescence se développant avec l'âge peut contribuer à limiter les capacités de défense immunitaire.

En conséquence, les chevaux DPIH ont particulièrement tendance à développer des foyers infectieux multiples et répétés, des infections chroniques qui compromettent leur survie : pneumonie, sinusite, entérite parasitaire, abcès de pied, piroplasmose, etc...

* Dans une région endémique pour la piroplasmose, les chevaux sont contaminés très fréquemment (par morsure de tique). Il est possible que chez les chevaux DPIH, le piroplasma persiste dans le sang et la moëlle osseuse, comme décrit chez le chien immunodéprimé à piroplasmose.

* Les dysfonctionnements immunitaires des chevaux DPIH sont mal caractérisés, et l'évolution de la lignée blanche, sa maturation dans la moëlle osseuse n'a jamais été étudiée.

Cette étude se propose de détecter

- s'il existe des différences dans l'examen cytologique de la moëlle osseuse de chevaux atteints de DPIH en comparaison à des chevaux contrôle

- d'évaluer si des piroplasmes (*Theileria equi*, *Babesia caballi*) sont observables et ou détectables par PCR dans la moëlle osseuse de ces groupes de chevaux.

Le bénéfice serait de mieux comprendre les dysfonctionnements leucocytaires des chevaux malades, de déterminer si leurs altérations immunitaires peuvent occasionner un portage chronique de piroplasmose et une piroplasmose clinique plus fréquente/sévère que chez des chevaux indemnes de DPIH.

Un effectif de 12 chevaux âgés de 15 ans et plus indemnes et de 12 chevaux à DPIH serait utilisé. Le statut de malade repose sur l'établissement d'un score clinique et d'un test de stimulation à la TRH. Une seule manipulation serait effectuée avec un test de dépistage de la maladie par prise de sang, et une ponction de moëlle osseuse sous sédation.

Cette étude se doit d'être réalisée chez l'espèce cible, le cheval. Un nombre minimal de chevaux pour assurer une puissance statistique suffisante a été retenu. Enfin, les chevaux seront hébergés en extérieur, laissés en troupeau, avec une surveillance et séance de renforcement positif (récompenses) quotidiennes. Les examens pratiqués sont très peu invasifs. L'aspiration de moëlle osseuse sera effectuée sous anesthésie locale et sédation pour prévenir la douleur. Des points limites précoces et adaptés seront mis en place en cas de complication consécutive au projet, ou non reliée à celui-ci.

15395 Les changements climatiques globaux entraînent des variations de température et d'accessibilité à l'eau au sein des habitats naturels. Lors de périodes de canicule, les températures élevées peuvent être associées à des conditions desséchantes. A l'échelle des paysages, la diversité des micro-habitats offre des refuges qui permettent aux organismes d'éviter ou de réduire les effets des conditions climatiques contraignantes. L'objectif de ce projet est de quantifier les réponses physiologiques et comportementale de vipères aspic exposées à des conditions plus ou moins sèches. Cette approche permet de quantifier l'effet de l'humidité de l'air sur la physiologie de ces organismes et de déterminer la capacité du comportement à compenser l'effet de conditions desséchantes.

Des vipères aspic seront maintenues dans des conditions contrôlées en enceintes climatiques. Un régime thermique chaud, au sein de la gamme physiologique de l'espèce, ainsi qu'une restriction de l'accès à l'eau modérée (1 mois) seront imposés. Les individus seront répartis entre deux modalités d'hygrométrie de l'air correspondant à des situations contrastées d'air peu ou plus desséchant. Le comportement d'hydrorégulation sera quantifié visuellement en suivant l'utilisation des abris par les animaux. Les réponses physiologiques au traitement expérimental seront quantifiées au travers de mesures de taux hormonaux (prises de sang - taux basal et réponse au stress). Le nombre maximum d'animaux utilisés dans ce projet sera de 48 vipères aspic. Il s'agira d'individus captifs, répartis dans 4 conditions expérimentales (4 lots de 12 individus). La vipère aspic est un modèle particulièrement pertinent pour tester nos hypothèses compte tenu de la forte dépendance aux conditions microclimatiques de ses habitats.

La règle des trois R a été prise en compte de la manière suivante

-Remplacement L'étude concerne spécifiquement les réponses physiologiques et comportementales d'adultes de cette espèce. Il n'est pas possible de remplacer les vipères vivantes par d'autres processus, les individus sauvages ont été remplacés par des individus captifs issus de populations reproduites en captivité.

-Réduction Le nombre d'individus sera réduit au minimum (12 par groupe) pour permettre de détecter des différences hormonales significatives

-Raffiner La restriction hydrique est réduite au minimum à une période courte pour ce taxon et telle qu'elle peut survenir en conditions naturelles. Les régimes thermiques et d'hygrométrie choisis correspondent à des conditions naturelles au sein de la gamme physiologique de cette espèce. La durée de manipulation est réduite au minimum et la quantité de sang prélevée par prise de sang sera limitée à 1.5 % du volume sanguin total de l'animal. Les conditions d'hébergement en captivité sont optimisées pour limiter le stress.

15396 L'érythropoïèse est un processus essentiel menant à la production des globules rouges, et son altération conduit à une insuffisance fonctionnelle des globules rouges et à des anémies parfois sévères. L'anémie est un problème majeur de santé humaine environ 6 à 8 % de la population mondiale est porteuse de mutation qui est délétère pour la fonction des globules rouges à l'état homozygote. Malgré des connaissances poussées, les bases génétiques du contrôle de l'érythropoïèse ainsi que les bases moléculaires de nombreuses pathologies érythroïdes restent soit mal caractérisées soit complètement inconnues.

Le projet proposé consiste à identifier par des approches à haut débit de nouveaux facteurs régulateurs de l'érythropoïèse, ainsi que les bases moléculaires de contrôle des gènes au cours du développement du tissu sanguin. Nous utiliserons ces données pour mieux comprendre les bases génétiques de deux pathologies touchant le système sanguin et les globules rouges les drépanocytoses/bêta-thalassémies (faisant partie des maladies génétiques les plus fréquentes au monde chez l'homme), et les leucémies aigües érythroïdes, des formes rares et très agressive de leucémies, pour lesquelles une caractérisation moléculaire est manquante et les options thérapeutiques très limitées. Nous souhaitons donc

- Décrypter des principes fondamentaux de la régulation des gènes,
- Identifier de nouveaux régulateurs de la dynamique chromatinienne dans les cellules érythroïdes,
- Analyser l'impact de ces régulateurs sur l'érythropoïèse normale et pathologique (e.g. bêta-thalassémies, leucémies aigües érythroïdes).

Plus particulièrement, le projet proposé vise à répondre aux 3 questions biologiques suivantes

(i) quel est le rôle de nouveaux facteurs de transcription au cours de l'érythropoïèse ?

Nous nous intéressons au rôle des facteurs ZEB1, ZNF143 et OGT au cours de l'érythropoïèse.

(ii) quel est le rôle de régions régulatrices (enhancers) distales dans le réseau de régulation érythroïde ?

Nous étudierons en priorité le rôle fonctionnel de la délétion d'un enhancer distal situé à 81kb en amont du gène Myb, qui est impliqué dans la sévérité des symptômes des bêta-thalassémies chez l'homme (iii) quelles altérations génétiques caractérisent les leucémies aigües érythroïdes ?

Nous analyserons le panel de mutations caractérisant les leucémies aigües érythroïdes humaines par xénogreffe chez la souris NRG.

REMPACER Nous avons dans un premier temps abordé ces différents points en utilisant des lignées cellulaires murines (MEL) et humaines (UT-7, K562). Cependant le caractère transformé de ces modèles cellulaires rend difficiles les extrapolations quant au rôle physiologique des facteurs étudiés, et surtout du contexte tissulaire (qui n'est pas reproduit dans les cultures ex vivo). Il n'existe pas d'alternative autre que l'utilisation d'animaux génétiquement modifiés pour évaluer avec précision et pertinence physiologique le rôle des nouveaux gènes de notre étude. Nous utiliserons le modèle souris *mus musculus*, permettant l'inactivation de manière tissu-spécifique et inductible des gènes d'intérêt.

REDUIRE Nous avons effectué avec le service de statistiques de notre institut les calculs permettant de déterminer qu'un nombre de 10 souris par groupe est le nombre minimum afin de mener à bien l'étude sans altérer son résultat, en atteignant une puissance statistique de 80% (voir paragraphe 3.3.5 pour plus de détails).

RAFFINER Toutes les dispositions ont été prises pour le raffinement des conditions d'élevage et d'expérimentation. Notamment, il existe au niveau de l'animalerie une structure en charge du bien-être animal (SBEA). Le bien-être animal est évalué quotidiennement. Les procédures expérimentales sont parfaitement définies et ont été publiées. Les points limites sont déterminés, aucune dérogation n'est nécessaire et nous ne prévoyons pas de souffrance animale. Plus particulièrement, en ce qui concerne l'anémie induite, même si aucune douleur n'est associée à un faible hématocrite, si le taux n'est pas restauré à hauteur de ~40 % (soit 0,8 fois le taux normal) une semaine après l'induction de l'anémie, les animaux seront euthanasiés. De plus, une attention particulière est portée à la formation de l'expérimentateur afin de limiter la durée de la procédure expérimentale et ainsi réduire la douleur et limiter les variations expérimentales. Une fiche de suivi est établie pour chaque animal de la procédure expérimentale.

Ainsi, la réalisation du projet nécessitera au maximum l'utilisation de 1738 animaux sur 5 ans.

15397 Les variations de pelage et la mue sont des phénomènes physiologiques peu étudiés chez le cheval. Aucune étude n'a été réalisée sur une année complète en France pour détecter les variations du cycle pileux.

Le Dysfonctionnement de la pars intermedia de l'hypophyse (anciennement « maladie de Cushing ») est une maladie neurodégénérative liée au vieillissement, très prévalente au sein de la population équine, dont la moyenne d'âge augmente de plus en plus. Les chevaux de 15 ans et plus sont touchés. Elle se caractérise par des anomalies de mue, avec tout d'abord un retard de celle-ci, puis progressivement une perte de la mue, des poils longs et bouclés toute l'année. Le dysfonctionnement hypophysaire a également d'autres conséquences hormonales, à l'origine de fourbure chronique, d'infections intercurrentes, de dégénérescence des ligaments suspenseurs, de perturbations métaboliques, qui raccourcissent significativement l'espérance de vie des chevaux malades.

Il existe un traitement médicamenteux, le pergolide, efficace dans la plupart des cas, et qui se donne quotidiennement à vie. L'efficacité du traitement repose en partie sur la précocité de sa mise en place. Or, les retards de mue et autres signes cliniques peu spécifiques sont détectés tardivement par le propriétaire et le vétérinaire. De plus, il n'existe pas de test endocrinien de routine et suffisamment fiable pour détecter la maladie à un stade précoce (dosage d'ACTH). Un test plus sensible mais encore imparfait est par contre disponible en recherche (test de stimulation à la TRH).

Cette étude se propose de détecter s'il existe des différences précoces dans le cycle du follicule pileux entre des chevaux âgés indemnes et des chevaux malades, que ce soit à un stade précoce ou un stade avancé de maladie, en comparaison à des chevaux âgés sains/contrôles. Le prélèvement de poils et de peau serait effectué mensuellement sur un effectif de 12 chevaux

indemnes et de 12 chevaux malades, leur différenciation reposant sur l'établissement d'un score clinique et d'un test de stimulation à la TRH. Cet effectif de chevaux serait hébergé au pré, sur un même site géographique, soumis aux mêmes variations de température et photopériode.

Dans un deuxième temps, les chevaux atteints de DPIH seraient traités par du pergolide pendant 2 mois, et un trichogramme, une dermatoscopie et une biopsie de contrôle seront effectués en fin de printemps/début d'été, afin d'objectiver l'impact du traitement sur le cycle du follicule pileux au moment de la mue printanière.

Cette étude se doit d'être réalisée chez l'espèce cible, le cheval. Un nombre minimal de chevaux pour assurer une puissance statistique suffisante a été retenu. Enfin, les chevaux seront hébergés en extérieur, laissés en troupeau, avec une surveillance et séance de renforcement positif (récompenses) quotidiennes. Les examens pratiqués (prise de sang et prélèvement de poils) sont très peu invasifs. La biopsie cutanée sera effectuée sous anesthésie locale pour prévenir la douleur. Des points limites précoces et adaptés seront mis en place en cas de complication consécutive au projet, ou non reliée à celui-ci.

15398 L'immunothérapie dans le traitement du cancer, notamment la vaccination anti-tumorale, a fait des progrès considérables ces dernières années. Nos travaux récents montrent que les lymphocytes T Natural Killer (NKTs) sont capables d'induire des réponses T cytotoxiques efficaces contre le développement tumoral. Par une approche de vectorisation (nanovaccin), nous avons montré que la délivrance simultanée de l'alpha-galactosylcéramide - un puissant agoniste de ces cellules - et d'antigènes tumoraux au sein des cellules dendritiques génère des réponses anti-tumorales efficaces chez la souris.

Les personnes âgées ont un système immunitaire dégradé, ce qui augmente l'incidence des cancers et réduit l'efficacité des vaccins. La sénescence cellulaire est un phénomène naturel lié au stress qui s'amplifie avec l'âge et dont l'impact sur les réponses immunes, notamment anti-tumorales, est encore mal compris. Notre objectif est d'optimiser la réponse anti-tumorale faisant suite à la vaccination chez les personnes âgées. Le modèle expérimental de la souris sera utilisé.

Dans un premier temps, nous comparerons le nombre et la fonction des cellules immunitaires chez des souris jeunes et des souris âgées avec un accent particulier sur les cellules NKT et les cellules dendritiques. Des tests fonctionnels dédiés à ces cellules seront développés. Différents types d'immuno-stimulateurs (adjuvants) seront testés. L'efficacité du nanovaccin sera ensuite comparée en fonction de l'âge et en fonction de la présence ou de l'absence des cellules sénescents. Pour cela, les souris seront traitées avec une drogue sénolytique. La qualité de la réponse T cytotoxique et le développement tumoral seront mesurés. Dans la deuxième partie, différentes formulations vaccinales seront proposées (souris âgées), notamment par l'utilisation combinée d'autres types d'adjuvants. La première partie du programme sera critique dans le choix de ces composés.

La demande concerne (i) l'analyse numérique et fonctionnelle des cellules immunes, (ii) l'analyse de la réponse immune induite par la vaccination et (iii) la détermination de l'efficacité des nanovaccins contre le développement tumoral (mélanome). Ces critères seront comparés en fonction de l'âge et en fonction de la présence, ou pas, de cellules sénescents.

Nous utilisons un modèle expérimental (souris) admis par la communauté scientifique travaillant dans le domaine. Notre équipe bénéficie actuellement d'une autorisation pour travailler sur ce type de projet (étude de la réponse immune, modèle de développement tumoral). L'évaluation rétrospective de ce protocole est en cours. Dans les deux procédures, des souris génétiquement modifiées (knock-out) pourront être utilisées. Nous proposons aussi des traitements, notamment avec des composés pharmacologiques.

Ce projet expérimental répond aux exigences des 3R, à savoir remplacement, réduction et raffinement. Au total, 2604 souris seront nécessaires pour atteindre nos objectifs. Cette utilisation maximise les données obtenues à partir de chaque animal, afin de limiter ou d'éviter l'utilisation subséquente d'animaux supplémentaires, et ce, sans pour autant compromettre le bien-être animal. Si nécessaire, des modifications des procédures sont prévues au cours des expérimentations afin de réduire la douleur et la détresse ainsi que d'améliorer le bien-être animal. Les animaux seront

manipulés individuellement afin de limiter tout stress des animaux non manipulés. Les souris ne sont pas soumises à des prélèvements répétitifs.

15399 Le syndrome des ovaires polykystiques est la cause d'infertilité féminine la plus importante (10% des cas d'infertilité). Cette pathologie se caractérise par des problèmes d'ovulation, des follicules kystiques diagnostiqués par échographie et le plus souvent par un hyper-androgénisme des patientes atteintes (hirsutisme, acné). Au niveau endocrinien, elle se caractérise aussi par des modifications importantes des taux sanguins d'hormones. Principalement considérée comme une pathologie strictement ovarienne, le rôle du système nerveux central dans le syndrome des ovaires polykystiques n'a jamais vraiment été exploré. Le but de ce projet est d'étudier l'implication du système nerveux central dans ce syndrome. Cette étude sera réalisée sur le modèle ovin dont les caractéristiques de reproduction, notamment

le taux d'ovulation, sont proches de celle de l'espèce humaine. L'étude des modifications structurales sera réalisée en imagerie par résonance magnétique (IRM).

Nous comparerons des brebis témoins cycliques avec des brebis présentant le syndrome d'ovaires polykystiques. Ce syndrome sera induit par une exposition des mères à la testostérone au cours de la gestation. Ce projet a été réfléchi pour respecter la règle des 3R

Remplacer nous ne pouvons étudier ce mécanisme physiologique complexe sans recours à l'animal. Pour l'imagerie IRM, nous disposons d'un IRM clinique adapté aux animaux de grande taille qui permettra d'obtenir des résultats plus facilement comparables aux observations réalisées en clinique.

Réduire L'utilisation de l'imagerie *in vivo* va permettre l'observation de nombreuses structures cérébrales en même temps, sur les mêmes brebis. Cet outil, en plus d'être non invasif, va donc permettre de réduire le nombre d'animaux utilisés. Quarante-sept brebis seront étudiés dans ce projet.

Raffiner les animaux seront hébergés en groupes sociaux stables, sur paille et avec du foin de qualité à volonté. Lorsque les animaux seront placés en cases individuelles, ils seront suffisamment proches et auront la possibilité de se sentir et se voir (parois ajourées). Ils seront placés sur une litière de paille et disposeront de foin de qualité, comme dans l'hébergement en groupe. Les manipulations des animaux se feront dans le calme.

15400 Les troubles du spectre autistique (TSA) sont caractérisés par des troubles de l'interaction sociale, des comportements répétitifs et stéréotypés. Plus récemment des troubles de la motricité ont été décrits comme étant des symptômes accompagnant aussi cette pathologie. Les tests utilisés couramment chez les rongeurs pour caractériser les TSA sont ceux de l'interactions courtes (quelques dizaines de minutes) entre 3 animaux mais ces tests ont des limites évidentes dans leur capacité de mettre en lumière des déficits qui sont transposables à l'Homme. Des approches récentes utilisent la possibilité d'identifier des souris, grâce à des puces individuelles qui émettent un signal radio (rf-ID ou radio frequency identity), de les suivre en groupe (4 souris ou plus) pendant plusieurs jours, 24h/24h.

L'objectif du projet est de déterminer les troubles sociaux en comparant les résultats obtenus par la la procédure dite Live Mouse Tracker (LMT), par rapport aux troubles identifiés par la procédure plus traditionnelle de test à 3 chambres (3-CT) dans un modèle murin des TSA, crée par injection d'acide valproïque (VPA).

Les objectifs du projet sont i) de comparer les paramètres d'interaction sociale détectés par le 3-CT et le LMT ii) d'évaluer le nombre de cellules de Purkinje au sein du cervelet dans le modèle de TSA iii) de comprendre l'implication des voies de la transmission synaptique au niveau moléculaire dans le modèle souris VPA en comparaison aux souris contrôles.

Nous avons pris en considération la règle de 3Rs pour Remplacer L'étude des bases comportementales, cellulaires et moléculaires dans les TSA nécessite la présence de réseaux neuronaux physiologiques et fonctionnels ceci est uniquement accessible dans des modèles d'animaux intègres. Il n'est donc pas possible d'utiliser des méthodes de substitution à l'animal

entier dans le cadre de cette étude. Réduire ce projet nécessitera au total l'utilisation de 110 souris, assurant un nombre final d'au moins 10 souris mâles et 10 souris femelles par groupe (VPA; Saline), ce qui permettra une analyse statistique valide de nos résultats expérimentaux. Raffiner Nous avons planifié nos expériences en gardant à l'esprit la nécessité de réduire, sinon de soulager l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'angoisse subie par les animaux, et dans le but d'obtenir plus d'informations pertinentes à moindre coût en terme de "mal être" animal. Le bien-être des animaux sera pris en compte à chaque étape par une surveillance quotidienne des animaux et l'apport d'enrichissement (élément de nidification).

Cette recherche est innovante et a le potentiel de fournir des informations critiques pour la compréhension d'une voie thérapeutique sociétale prometteuse pour les patients atteints de TSA, résultats qui peuvent amener à un meilleur traitement de cette maladie chez l'homme.

15401 Mot-clés : Résidus, produits pharmaceutiques vétérinaires, animaux de rente, délais d'attente, additifs alimentaires vétérinaires

Raison du projet : Lorsque le produit testé est un produit pharmaceutique vétérinaire, les études de déplétion de résidus répondent aux prescriptions de la réglementation européenne (European Medicine Agency, VICH topic GL48) ou à celles de la FDA (CVM GFI #207). Lorsque le produit testé est un additif alimentaire vétérinaire, les études seront basées sur les lignes directrices de l'EFSA "Guidance on the assessment of the safety of feed additives for the consumer" (10.2903/j.efsa.2017.5022; adopted : 27 September 2017).

Objectif du projet : Le projet vise à évaluer en laboratoire les déplétions de résidus de produits vétérinaires administrés à l'animal de rente, dans le but d'établir les délais d'attente pour les produits destinés à la consommation humaine (viande, abats, œuf, lait).

Globalement, l'évaluation de la déplétion de résidus implique l'administration du produit d'étude à la dose maximale prévue selon les modalités d'administration prévues et selon la durée maximale prévue, chez l'espèce cible. Des prélèvements de lait, d'œufs ou de tissus sont alors effectués à intervalles réguliers afin de doser les teneurs en résidus marqueurs du produit vétérinaire étudié. L'analyse des résultats permet de définir un temps d'attente pour le produit testé ceci afin de garantir la sécurité des consommateurs. Le délai d'attente sera déterminé en fonction des Limites Maximales de Résidus (LMR) fixées par la Commission européenne.

Bénéfice attendu du projet : Les études de résidus sont nécessaires au dossier d'Autorisation de Mise sur le Marché de tout produit vétérinaire administré aux animaux de rente.

Animaux : Le nombre d'animaux utilisé est fonction de l'espèce cible, du produit vétérinaire et de ses modalités d'administration, et de la denrée alimentaire d'origine animale concernée. Pour l'évaluation des résidus dans les viandes et abats, les minimas suivants sont fixés 4 animaux par temps d'abattage pour les mammifères (bovins, ovins, caprins, porcins, lapins, équins), et 6 animaux par temps d'abattage pour les volailles (VICH GL48). Quatre temps d'abattage sont à minima requis pour ce type d'étude, mais cinq temps sont généralement nécessaires pour mieux définir les délais d'attente. Les effectifs animaux sont donc a minima de 20 mammifères et de 30 volailles par étude de résidus dans les viandes. L'étude des résidus dans le lait, suite à l'administration d'un produit vétérinaire à des vaches, brebis ou chèvres en lactation ou au tarissement, requiert un effectif minimum de 20 ruminants. Pour l'étude des résidus dans les œufs, le nombre de volailles pondeuses doit permettre une collecte minimale de 10 œufs par jour 20 volailles sont nécessaires à minima. Considérant que le nombre moyen d'études envisagées par an est de 2 pour les études résidus 'viande' en mammifères, de 1 pour les études résidus 'viande' en volailles, de 1 pour les études résidus 'lait' et de 1 pour les études résidus 'œufs', nous tablons sur un nombre « enveloppe » de 550 animaux maximum sur la période de 5 ans.

Domages attendus : Aucune souffrance n'est attendue, autre que celle provoquée par l'administration du produit d'étude. La souffrance attendue est donc considérée comme légère.

Application des 3R :

- Remplacement : Le projet répondant à des contraintes réglementaires, il n'y a pas d'alternative à l'utilisation d'animaux de l'espèce de destination du produit.

- Réduction Les effectifs animaux minimaux sont fixés par la réglementation. En principe, le nombre d'animaux utilisé est calculé de telle sorte que l'expérimentation soit interprétable, afin de tenir compte de la variabilité biologique individuelle.

- Raffinement Les conditions d'hébergement des animaux seront adaptées aux besoins physiologiques de ces derniers et leur permettront d'exprimer le plus possible leur gamme normale de comportements. La contention des animaux visera à limiter au maximum le stress des animaux. Le bien-être des animaux sera évalué quotidiennement par le personnel en charge des animaux (animaliers et/ou vétérinaires)

Les points limites seront adaptés à chaque espèce. En cas de dépassement des points limites, les animaux seront exclus de l'étude pour être traités, ou euthanasiés selon les méthodes définies en annexe IV de l'arrêté du 1er février 2013.

15402 Objectif du projet Évaluer l'activité pharmacocinétique ainsi que le profil pharmacologique de molécules après administration par voie systémique chez le rat ou la souris dans le cadre de pathologie musculo-squelettiques.

Avantages Ce projet a pour but de démontrer l'activité pharmacocinétique de molécules en développement pour des pathologies musculo-squelettiques qui n'ont à l'heure actuelle aucun traitement disponible. Les données ainsi obtenues contribueront à la sélection de molécules et au choix des doses à utiliser chez l'homme pour les indications thérapeutiques visées.

Domages escomptés Il s'agit de molécules en développement, il est donc possible de voir apparaître des effets secondaires indésirables tels que des problèmes rénaux ou hépatiques liés à l'élimination des molécules. Les molécules testées appartiennent à la famille des protéines. Un produit analgésique pourra être utilisé si jugé nécessaire par le vétérinaire référent et/ou le directeur d'étude. Dans le cas où ces effets seraient importants des points limites stricts seront appliqués.

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

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

Choix des espèces Les espèces rats et souris seront utilisées en raison de l'abondance de littérature sur ces modèles et de l'existence d'outils spécifiques permettant l'analyse des protéines ou des gènes modulés dans ces modèles au niveau de différents organes.

Nombre d'animaux Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet a été réduit à son minimum sans compromettre les objectifs du projet. Selon les méthodes d'analyses utilisées sur les organes (biochimie, biologie moléculaire, morphologie, etc...) et compte-tenu des variations interindividuelles anticipées, un maximum de 10 animaux par groupe expérimental sera utilisé pour permettre une analyse statistique robuste des résultats générés. Dans la mesure du possible le micro-sampling sera utilisé de manière à pouvoir prélever plusieurs fois les animaux et réduire ainsi le nombre d'animaux par temps de prélèvement.

Le nombre optimum d'animaux par groupe expérimental sera défini par une approche statistique adaptée. Sur une période de 5 ans, un maximum de 17600 animaux (souris et rats) sera utilisé dont 10% correspondants à des animaux surnuméraires.

Conditions d'hébergement et de soins

L'hébergement se fait en collectif sauf en cas de bagarre entre congénères qui pourrait nécessiter l'isolement d'un ou plusieurs animaux. Cet isolement ne sera pas supérieur à 7 jours. Si un animal devait être isolé, il sera attribué à un groupe d'étude permettant de respecter cette durée maximum d'isolement.

Des techniques d'enrichissement adaptées aux besoins spécifiques et individuels des animaux seront apportées leur permettant de reproduire au mieux leur comportement naturel (ex maisonnette ou ouate dans la cage, buchettes...). La stratégie d'enrichissement est régulièrement revue et mise à jour.

Le suivi des animaux sera assuré quotidiennement et des points limites spécifiques ont été établis afin d'anticiper toute dégradation de l'état de santé général des animaux et, le cas échéant, d'appliquer des protocoles d'analgésie adaptés.

15403 La dystonie est un trouble qui se caractérise par des contractions musculaires involontaires entraînant des mouvements répétitifs. Le mot dystonie désigne un groupe de pathologies complexes avec des causes variées qui peuvent entraîner des handicaps de degrés différents. Le nombre de personnes souffrant de dystonie en France est estimé à 45'000 et à 250'000 aux Etats-Unis.

La spasticité musculaire, quant à elle, est considérée comme une sur-contraction inhabituelle et involontaire du ou des muscles. Ce trouble du système nerveux central résulte en une crispation et une rigidité accrue du muscle touché. Cette hypertonie musculaire entraîne une résistance aux étirements et une contraction continue des muscles qui peut affecter la parole, la locomotion et la posture. Le nombre de personnes souffrant de spasticité dans le monde est estimé à 12 millions.

Le traitement de ces pathologies implique la prescription de traitements systémiques - myorelaxants oraux tels que le baclofène, les benzodiazépines, le dantrolène ou la tizanidine, qui comportent tous des effets secondaires conséquents (sommolence, nausée, fatigue), ou la mise en place intrathécale d'une pompe à baclofène. Alternativement, les injections locales de toxines botuliques de type A dans le muscle affecté réduisent également la spasticité. Les injections de toxines botuliques présentent plusieurs avantages, en offrant une action locale prolongée avec une seule administration, et avec une efficacité plus spécifique sur la contraction musculaire, limitant donc les effets secondaires observés avec les myorelaxants systémiques décrits ci-dessus. Cependant, l'effet de la toxine botulique n'est ressenti que 3 à 7 jours après l'injection, avec un pic d'efficacité à 3 semaines nécessitant un contrôle chez le médecin qui vise à évaluer cette efficacité, et éventuellement à ajuster la dose de toxine.

L'objectif de notre projet est de mettre en évidence l'effet bénéfique de l'utilisation locale de myorelaxants à effet rapide sur la contraction musculaire pour les patients souffrant de dystonie et de spasticité. Nous utiliserons à cette fin des rats, chez qui seront injectés localement les molécules étudiées, soit dans les membres antérieurs pour un « test de serrage (Grip-test) », soit dans les membres postérieurs pour un « digital abduction score ». Nous étudierons également la durée d'action de ces molécules ainsi que l'effet d'injection locales successives de ces molécules d'intérêt sur l'efficacité de celles-ci.

Il n'existe à ce jour pas de test *in vitro* qui permette de tester la pharmaco-dynamique locale de ces molécules (cinétique de l'effet myorelaxant) qui est l'élément clé de leur valeur clinique. Il n'existe pas non plus de modèle *in vitro* pour tester l'effet d'injections répétées sur le long terme. Ces données serviront de base à la conception d'essai clinique chez l'homme.

Afin d'établir les groupes expérimentaux, nous utiliserons pour cette étude un maximum de 515 rats. Comme décrit dans la phase de set-up expérimental en annexe, nous veillerons à diminuer le nombre d'animaux utilisé pour le projet en étudiant la possibilité de réinjecter des animaux, si possible.

Pour leur confort, les animaux seront hébergés en groupe invariable (3 max) avec enrichissement et surveillés quotidiennement. Tous les gestes douloureux seront réalisés sous anesthésie.

15404 Avec une incidence d'environ 60 à 70%, les troubles du sommeil sont très fréquents chez les parkinsoniens. Les patients présentent des insomnies associées une désorganisation de l'architecture du sommeil. De plus dans la journée, les patients sont somnolents et ont du mal à rester éveillés ce qui se traduit par un temps excessif diurne passé à dormir avec des endormissements irrépressibles. Les somnolences diurnes excessives sont très invalidantes car

incompatibles avec la réalisation d'activités quotidiennes nécessitant de l'attention, comme la conduite automobile, et de ce fait, elles contribuent à fortement limiter l'autonomie des patients. Ces troubles ne sont pas du tout améliorés par les traitements disponibles et sont même souvent aggravés. La prise en charge de ce trouble est donc indispensable pour améliorer la qualité de vie des patients. L'origine de ces troubles du sommeil n'est pas du tout élucidée et plusieurs hypothèses ont été émises, parmi elles on s'intéressera à l'effet de la déplétion en dopamine qui pourrait altérer le fonctionnement des centres d'éveil qui ne seraient alors plus suffisamment activés pour maintenir efficacement un éveil diurne. La disparition des neurones au niveau des centres de l'éveil chez le patient narcoleptique constitue, d'ailleurs, une explication à la survenue d'une somnolence diurne excessive associée à des accès irrésistibles de sommeil qui caractérise cette maladie. Sur le plan expérimental, il a récemment été montré que les singes présentaient des troubles de sommeil s'apparentant à ceux rencontrés chez le patient. En effet, l'architecture de leur sommeil est complètement désorganisée, ils présentent des éveils fréquents pendant la nuit et un temps excessif passé à dormir pendant la journée qui correspond à des somnolences excessives diurnes. Le singe parkinsonien constitue donc un modèle pertinent pour mieux comprendre la physiopathologie de ces troubles du sommeil et pour évaluer l'efficacité d'un traitement sur ces troubles. Ainsi, nous avons pour objectif d'étudier l'activité des neurones des centres de l'éveil chez des singes parkinsoniens afin de mieux comprendre la physiopathologie de la somnolence excessive diurne. Cette première partie de l'étude nous permettra de déduire des paramètres de stimulation électrique pouvant s'appliquer sur ces structures afin de palier à l'altération de leur fonctionnement. Ainsi dans une 2ème partie, nous évaluerons l'effet thérapeutique de la stimulation électrique diurne de ces régions cérébrales. Cette étude (en 2 parties) nécessitera 14 animaux, au maximum, afin d'obtenir des résultats exploitables et transposables à l'homme 6 pour la partie fondamentale qui visera à caractériser le dysfonctionnement des centres cérébraux impliqués dans le maintien de l'éveil et 8 autres pour la partie thérapeutique préclinique qui permettra d'évaluer les effets thérapeutiques de stimulation électrique chronique de ces centres. Ce nombre d'animaux a été déterminé grâce à un test statistique appliqué pour chaque partie de l'étude, permettant de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en gardant un nombre suffisant pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à une grille codifiant le niveau de douleur. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance. Ces questions seront donc appréhendées à un niveau préclinique dans un modèle de parkinsonisme proche de la maladie humaine, il nous est donc impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique. Ce projet préclinique vise à évaluer l'efficacité de la stimulation cérébrale profonde sur le trouble du sommeil du parkinsonien il nous permettra aussi de mieux comprendre la physiopathologie du sommeil et ainsi de proposer des thérapies pour des pathologies du sommeil.

15405 Il est maintenant bien établi qu'il existe une formation de nouveaux neurones tout au long de la vie dans le cerveau des mammifères, en particulier dans une structure importante pour la mémoire, l'hippocampe. Les nouveaux neurones produits (néoneurones) s'intègrent aux réseaux formés de neurones issus de la période développementale, mais semblent posséder des propriétés spécifiques. Nous avons récemment démontré que l'inhibition ou la stimulation des neurones nés à l'âge adulte pouvait respectivement diminuer ou améliorer les performances de mémoire spatiale à long terme (c'est à dire la capacité à utiliser une carte spatiale pour s'orienter dans un environnement). Afin de démontrer le rôle des néoneurones dans les processus de mémoire de façon plus générale, nous devons valider nos effets dans une autre tâche comportementale qui dépend elle aussi de l'hippocampe. Cette tâche sera un conditionnement au contexte qui reflète la capacité à associer un environnement avec un événement.

Afin de moduler l'activité des neurones, nous injecterons dans l'hippocampe de rat, des vecteurs viraux, c'est-à-dire des agents qui infectent les cellules lors de leur naissance. Ces vecteurs contiennent des molécules qui vont permettre d'inhiber ou de stimuler spécifiquement les cellules infectées par une simple injection intra-péritonéale d'un composé sélectif de ces molécules.

Dans cette étude, des rats adultes âgés de 2 mois seront injectés au niveau du cerveau avec les vecteurs stimulateurs ou inhibiteurs ou des vecteurs contrôles. Puis les rats seront entraînés dans la tâche de conditionnement de peur au contexte. Celle-ci consiste à associer un contexte spécifique à un faible choc électrique de telle manière à ce que lorsque l'animal est replacé dans le contexte quatre semaines plus tard, il exprime un comportement de peur. C'est au cours de ce test que nous inhiberons ou stimulerons les néoneurones. A la suite de l'étude comportementale nous vérifierons par des techniques d'immunologie les taux d'infection des néoneurones.

Afin de respecter la règle des 3R, des procédures seront développées de façon à réduire au maximum le nombre et l'inconfort des animaux. Notamment, dans un souci de respect du R de réduire, nous prévoyons un maximum de 15 rats par groupe, soit 180 rats au total, nombre minimal nécessaire pour faire des analyses statistiques cohérentes.

Aussi, dans le respect du R de raffiner, un soin particulier sera accordé à l'observation des animaux et à leurs conditions d'hébergement, en particulier lors des périodes post chirurgicales. De plus, des traitements appropriés (anesthésie, anti-inflammatoire, anti-douleur) seront utilisés pour pallier la douleur associée aux manipulations d'injections. En ce qui concerne le remplacement, il est important de noter que cette étude nécessite la visualisation et l'intégrité d'un réseau englobant différentes régions du cerveau et qu'il ne peut donc être réalisé sur des modèles *in vitro*.

Cette étude bien que nécessitant des procédures de classe modérée contribuera à une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires impliqués dans la formation et la rétention de la mémoire. Ces connaissances sont indispensables pour pouvoir développer des outils thérapeutiques capables de diminuer l'impact des mémoires traumatiques comme cela est le cas dans les troubles de stress post-traumatiques ou bien de renforcer la mémoire dans le cas des maladies cognitives comme la maladie d'Alzheimer ou bien lors du vieillissement pathologique.

15406 Contexte scientifique : Les maladies cardiovasculaires entraînent la mort de plus de 17 millions de patients par an dans le monde. La prévalence de ces pathologies accroît de manière progressive et représente un problème majeur de santé publique. L'athérosclérose est la principale cause du développement de maladies cardiovasculaires, et peut notamment provoquer des infarctus du myocarde ainsi que des accidents vasculaires cérébraux. L'athérosclérose se caractérise par la dégradation de la paroi des vaisseaux sanguins, au sein de laquelle une accumulation de graisses et de globules blancs forme ce que l'on appelle une plaque d'athérome. Lors d'un développement avancé des plaques d'athérome, celles-ci peuvent totalement obstruer le vaisseau sanguin et bloquer la circulation. Elles peuvent également se rompre et déverser dans la circulation sanguine de petits fragments de plaque pouvant obstruer des vaisseaux sanguins plus étroits, par exemple au niveau du cerveau. Des études récentes ont permis de mettre en évidence un rôle central du métabolisme, et notamment du glucose, au cours du développement de la plaque d'athérome. Ce projet vise à comprendre comment précisément l'utilisation du glucose au niveau des cellules immunitaires (appelées globules blancs) affecte la progression de la maladie.

Problématique : Une augmentation du métabolisme glucidique est observée chez les patients atteints de maladies cardio-vasculaires. Ceci est associée à la progression de la pathologie mais les mécanismes sous-jacents restent à ce jour peu étudiés. Nous allons utiliser des inhibiteurs pharmacologiques et des modèles pré-cliniques afin de décortiquer la contribution des voies intracellulaires impliquées dans le métabolisme glucidique sur la progression de l'athérosclérose.

Hypothèse de travail : Nous allons tester l'hypothèse que l'internalisation et la redistribution du glucose dans diverses voies métaboliques intracellulaires affectent de manière différente la formation et l'augmentation de la taille de la plaque d'athérome. Pour cela nous allons utiliser des modèles murins qui récapitulent les manifestations de l'athérosclérose en combinaison avec des inhibiteurs pharmacologiques. Notre objectif est de 1) soit bloquer l'entrée du glucose dans les cellules 2) soit favoriser son entrée sélectivement dans une seule et unique voie intracellulaire. Nous déterminerons dans ces modèles la taille de la plaque d'athérosclérose et des facteurs de risques connus pour favoriser son développement (cholestérol, triglycérides, nombre de cellules immunes).

Justification du modèle et raffinement : Les maladies cardio-vasculaires sont des pathologies complexes dans lesquelles de multiples voies nutritionnelles et physiologiques interviennent. Une approche *in vitro* de culture cellulaire n'est pas appropriée afin de répondre correctement aux demandes de cette problématique. Ainsi, des modèles murins athérogéniques ont été développés et validés par la communauté scientifique comme outils d'études précliniques intégrant la complexité de la problématique.

Les procédures proposées sont basées à la fois sur une justification scientifique et tiennent compte du bien-être animal. D'autre part, l'utilisation de modèles murins est régie par la règle des « 3R »

- Réduction afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, nous utiliserons une approche statistique nous permettant de prévoir le nombre d'animaux nécessaires pour répondre clairement à notre question scientifique, sans utiliser plus de souris que nécessaires. De plus, nous utiliserons aussi bien les souris mâles que les souris femelles.

- Remplacement comme décrit précédemment, aucune méthode alternative *in vitro* ou *in silico* n'est adaptée afin de remplacer totalement le modèle murin. Toutefois, nous avons mis en place une approche utilisant la technologie d'édition génétique CRISPR-Cas9 permettant de remplacer partiellement ces modèles murins. Plus précisément, nous utiliserons cette technologie afin de modifier à façon le génome des cellules de moelle osseuse provenant de souris « sauvages » surnuméraires générées lors de croisement de souris hétérozygotes dans notre élevage. Ces cellules modifiées *in vitro* seront ensuite ré-implantées dans nos modèles murins lors d'une procédure de transfert de moelle osseuse. Cette méthode de remplacement permettra d'éviter l'utilisation d'au moins quatre lignées de souris supplémentaires.

-Raffinement la mise en place de points limites régissant le déroulement précis des procédures permet l'amélioration du bien-être animal afin de diminuer de manière optimale la détresse et l'angoisse des animaux. Pour chaque procédure, nous avons pris en compte la gestion de la souffrance, l'angoisse et la douleur pour nos animaux. Notamment, des buchettes de bois seront mises à disposition des animaux nourris avec de la nourriture riche en graisse (nourriture molle) afin de répondre à leur besoin naturel de ronger. Les injections chroniques pouvant dans de rares cas induire une inflammation cutanée, nous prendrons les mesures nécessaires pour réduire la souffrance des animaux associée. Au cours des procédures sévères, la manipulation des souris se fera sous anesthésie afin de réduire la souffrance et l'angoisse des animaux. Les cages contiennent de la litière permettant d'éviter le contact avec le plastique et sont enrichies avec un abri en plastique et du matériel de nidification. Les animaux auront libre accès à de l'eau et de la nourriture.

Perspectives : Cette étude pourrait ouvrir de nouvelles perspectives de traitement visant à diminuer la mortalité induite par les maladies cardio-vasculaires. Afin de pouvoir générer des résultats robustes, nous avons calculé (test de significativité statistique) que 360 souris devraient être utilisées et réparties sur une période de 4 ans. L'ensemble des procédures proposées dans ce projet sont connues comme non remplaçables par des procédures ne faisant pas intervenir directement l'animal.

15407 La fibrose hépatique est caractérisée par une accumulation de tissus cicatriciels dans le foie, empêchant son bon fonctionnement. La fibrose hépatique peut être d'origine autoimmune ou congénitale. Elle peut être également la conséquence d'infections virales (hépatite B ou C), bactériennes ou parasitaires mais aussi liée à l'alimentation comme dans la stéatohépatite non alcoolique (NASH), à la prise de certains médicaments ou à la consommation excessive d'alcool. Enfin la fibrose hépatique peut être engendrée par une obstruction des voies biliaires dans les cas de cholangite biliaire primitive et cholangite sclérosante primitive.

La fibrose hépatique est généralement déclenchée par un stimulus inflammatoire chronique ou répété. L'inflammation va activer les cellules stellaires hépatiques qui vont produire une quantité anormale de collagène rendant le tissu fibreux. La fibrose peut être réversible suite à un traitement ou à un changement de régime alimentaire dans le cas du NASH mais elle peut conduire à une cirrhose, couplée ou non à un hépatocarcinome et conduire à une insuffisance hépatique. Dans ce

cas là, le processus est irréversible et à l'heure actuelle aucun traitement, hormi la greffe de foie, ne permet soigner les patients.

Les modifications patho-physiologiques nécessaires au développement de cette maladie sont très complexes et nécessitent la mobilisation d'effecteurs cellulaires et moléculaires très nombreux et la rupture dans la coordination de leur intervention. Il est impossible d'explorer l'ensemble de ces événements par une approche substitutive de culture cellulaire. Il est donc nécessaire de pouvoir évaluer sur des modèles physiologiques intégrés l'impact de nouveaux candidats médicaments pour mieux traiter ces pathologies. Afin d'induire la fibrose hépatique chez la souris, nous utiliserons différents procédés. Le premier consiste en la ligature du canal biliaire entraînant une obstruction et l'accumulation des sels biliaires provoquant une inflammation. Dans les deux autres procédures, les souris seront placés sur régime "Western diet" riche en gras, en sucre et en cholestérol ou sur régime déficient en méthionine et choline (MCD). Ces deux régimes vont entraîner l'accumulation de graisses dans le foie et une inflammation. Nous utiliserons un maximum de 1800 souris sur la totalité du projet, toutes procédures confondues.

Dans le respect de la règle des 3R, et lorsque cela est possible ces candidats médicaments sont évalués sur culture cellulaire ou organe isolé préalablement aux tests animaux afin de remplacer ou de réduire le nombre d'animaux impliqués dans les protocoles. Nous utiliserons le nombre minimum de souris nécessaire à une analyse statistique en prenant en compte la variabilité inter-individuelle. D'autre part, un raffinement des protocoles sera effectué en fonction des avancées technologiques dans le domaine. Les souris sont hébergées selon les conditions de la nouvelle réglementation 2010/63 en unités individuelles ventilées de type III ou IV avec enrichissement de l'environnement (composants de nidification et igloo). Chaque animal entrant dans une étude disposera d'une fiche individuelle de suivi sur laquelle tous traitements et observations seront reportés. L'état de santé des animaux sera évalué quotidiennement selon des critères définis par l'association française des sciences et techniques de l'animal de laboratoire (AFSTAL), d'apparence physique (perte de poids significative, gêne respiratoire) et comportementaux (souris prostrée, agressivité) définis en accord avec le comité de suivi du bien-être animal de notre établissement. Une dégradation trop importante de l'état de santé (au delà d'un score de 13 selon les critères détaillés dans les procédures expérimentales) pourra entraîner l'arrêt immédiat de l'expérimentation. Certains critères suffiront à eux seuls à l'arrêt de l'expérience, telle qu'une perte de poids trop importante ou la suffocation de l'animal.

15408 Les études récentes sont de plus en plus nombreuses à mettre en lumière une forte implication du microbiote intestinal dans la maturation du système immunitaire offrant des perspectives intéressantes. Il est nécessaire de chercher les moyens de rehausser la protection immunitaire des populations à risques dans différents contextes (risques infectieux, immunothérapie).

Dans ce projet, nous nous concentrerons sur l'évaluation de l'influence du microbiote et de ses modulations sur la réponse immunitaire vaccinale en utilisant un modèle murin établi de vaccination anti-grippale.

Dans les pays en voie de développement, la grippe saisonnière est reconnue comme un problème de santé publique. Un vaccin est développé tous les ans. Obtenir une "efficacité vaccinale antigrippale totale" en Europe pourrait réduire le nombre d'infections. L'efficacité vaccinale est très variable d'un individu à l'autre. L'obtention d'une réponse immunitaire homogène et complète passe par la compréhension de la réponse immunitaire à la stimulation vaccinale.

La compréhension grandissante de la flore digestive a permis d'établir des profils de microbiotes associés à des sujets sains ou des profils "pathologiques" associés à des pathologies digestives, comme le diabète ou l'obésité. Le microbiote module les phénomènes de tolérance immunitaire et d'élimination des pathogènes. On constate que dans certaines conditions, les réponses vaccinales peuvent être altérées par un traitement antibiotique.

Plusieurs études se sont intéressées à l'administration de produits pouvant stimuler ou moduler la réponse immunitaire. Nous pouvons rapporter des effets probants de probiotiques, définis comme des bactéries ayant une action bénéfique en terme de santé après administration orale, ou de

prébiotiques, qui sont des constituants absorbés par le tube digestif, souvent des sucres, et agissant aussi sur la régulation du microbiote. L'enrichissement réfléchi du microbiote intestinal, orienté non seulement sur les espèces stimulant la réponse immunitaire, mais aussi guidé par la compréhension des interactions entre les différents acteurs de la réponse vaccinale, peut permettre un renforcement de nos stratégies de stimulation immunitaires. Les prébiotiques et les probiotiques sont connus pour moduler l'activité du microbiote.

Nous pensons pouvoir améliorer l'immunité suite à la vaccination en complétant les souris avec des prébiotiques ou des probiotiques. La réponse vaccinale est explorée en évaluant les réponses immunitaires comme la production d'anticorps. Nous utiliserons dans nos analyses les technologies de la métabolomique et de la métagénomique afin d'optimiser l'analyse des échantillons prélevés sur les animaux. Ces résultats seraient prometteurs pour différentes thérapies impliquant le système immunitaire.

L'objectif scientifique est d'investiguer les interactions entre le microbiote et le système immunitaire. De nombreux paramètres ne peuvent pas être modélisés dans un système *in vitro*. Cette étape de recherche d'interactions entre des bactéries et l'Homme n'a pas d'alternative à l'utilisation d'organismes vivants. Le projet nécessite l'utilisation de 180 souris pour pouvoir conduire des études statistiques puissantes avec un très grand nombre de variables. Toutefois, il est possible que seulement la moitié des animaux permette d'atteindre les objectifs fixés, dans ce cas, nous réduirons le nombre d'animaux utilisé au strict minimum. La procédure expérimentale correspond à une contrainte légère pour les animaux. La stratégie vaccinale permet de ne pas avoir à utiliser d'adjuvant et l'injection sera réalisée sous anesthésie. Les animaux seront hébergés dans un environnement contrôlé et observés régulièrement afin d'anticiper l'apparition des points limites fixés.

15409 A l'heure actuelle, on pense que les pathologies neurodéveloppementales telles que l'autisme ou l'épilepsie sont dues en partie à des facteurs génétiques mais il reste encore à les caractériser et à préciser leurs rôles. Pour mieux comprendre les mécanismes associés aux troubles du développement du cerveau caractéristique de ces pathologies, l'étude électrophysiologique chez l'animal est indispensable. Dans ce domaine l'utilisation de lignée de souris transgéniques c'est-à-dire possédant la même mutation sur un gène impliquée dans les troubles du développement cérébral chez l'homme est un outil indispensable pour faire avancer la recherche.

Le cerveau est composé d'un ensemble de circuits neuronaux précis et complexes reliant de grands ensembles de neurones. Lors du développement, les neurones acquièrent très tôt des caractéristiques moléculaires et anatomiques distinctes. Ces dernières années, plusieurs gènes candidats ont été identifiés. Ces gènes sont exprimés dans le cerveau des mammifères et nous soumettons ici l'hypothèse que ces gènes contrôlent le développement des circuits de neurones au cours de la formation du cerveau, et participent à l'âge adulte au bon fonctionnement du cerveau.

Règle des 3R.

Remplacer Ce projet s'intègre dans un projet plus global combinant différents travaux de recherche complémentaires allant de l'étude biochimique ou bio moléculaire au comportement. Beaucoup d'études « in-vitro » sont donc effectuées en amont de l'utilisation de lignées d'animaux pour limiter au maximum leur utilisation.

Raffiner Pour supprimer l'angoisse, la détresse ou la douleur subie par les animaux au cours de l'expérience, les animaux sont élevés en cage collective enrichie et des points limites suffisamment précoces ont été mis en place.

Réduire Pour n'utiliser que le nombre minimal d'animaux tout en garantissant la validité scientifique et statistique des résultats, nous considérons qu'un nombre minimum de 12 animaux est nécessaire pour chacune de nos huit conditions expérimentales. Nous utiliserons dans ce projet cinq lignées de souris transgéniques. Notre projet portera donc sur 96 souris par an et soit un total d'animaux nécessaire à ce projet de 480 souris sur 5 ans.

15410 L'imagerie préclinique *in vivo* permet de mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques et d'évaluer rapidement de nouvelles stratégies médicales. Ces techniques sont mises à la disposition de la communauté scientifique sous forme de plateformes ouvertes aux académiques comme aux industriels. Nous proposons de mettre en place une formation qui aborde les principales modalités d'imagerie *in vivo* (anatomique, fonctionnelle et moléculaire) disponibles à l'heure actuelle ainsi que le suivi des animaux.

Les principes théoriques des différentes modalités sont présentés par des chercheurs, médecins experts et des industriels du domaine. En complément, des ateliers d'imagerie en situation réelle au sein des plateaux techniques permettront la démonstration des potentialités et champs d'applications de chaque technique.

Objectifs

- Aborder les principes théoriques et les aspects pratiques de chaque technique d'imagerie
- S'initier aux dernières technologies
- Evaluer les potentialités et les limites des différentes techniques d'imagerie
- Intégrer un réseau de scientifiques régionaux intéressés par l'imagerie médicale

Programme

- Formation théorique Optique, Bioluminescence, Fluorescence, Imagerie Nucléaire, IRM, Echographie, Microtomographie Rayons-X, Tomographie par cohérence optique, Endomicroscopie confocale laser, Anesthésies et Analgésies en Expérimentation Animale.
- Formation pratique des ateliers par petits groupes sur toutes les modalités d'imagerie avec des modèles murins.

Pour cette formation, un total de 50 souris SCID Beige femelles de 8 semaines seront utilisées pour la formation ce qui représente 10 souris par atelier IRM, imagerie optique (bioluminescence et fluorescence), PET-FDG, Tomodensitométrie et échographie.

La règle des 3 R s'applique sur ce projet

Remplacement l'exploration non invasive via l'imagerie est une méthode permettant d'assurer un suivi longitudinal en limitant la souffrance animale ainsi que le nombre d'animaux

Raffinement Les animaux sont anesthésiés pour chaque procédure et une attention particulière est apportée au maintien de leur température corporelle pendant l'anesthésie.

Réduction Le nombre d'animaux a été réduit un minimum afin de pouvoir permettre aux participants de manipuler.

Un suivi quotidien des animaux de leur arrivée jusqu'à leur euthanasie sera effectué par du personnel formé. Les animaux seront hébergés par groupe de 5 avec de l'enrichissement tel que des igloos et du sopalin. Tout signe de douleur ou de prostration entrainera une euthanasie de l'animal prostration, apathie, perte d'appétit, vocalises, agressivité, etc.

15411 Les molécules psychoactives telles que la nicotine ou l'alcool sont des substances qui agissent principalement sur le système nerveux central dont elles altèrent le fonctionnement. La co-intoxication avec plusieurs molécules psychoactives comporte d'autant plus de dangers que les mécanismes d'action de certaines interactions sont méconnus. Il a été montré, par exemple, que l'alcool renforce les effets toxiques de l'ecstasy qui n'a pourtant pas du tout le même mode d'action. Bien que la co-administration de plusieurs molécules psychoactives soit dangereuse, elle reste fréquente d'où l'intérêt de mieux comprendre les mécanismes de ces interactions au niveau cérébrale en imagerie.

Le but de ce projet est d'utiliser l'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique, technique non invasive et a-traumatique utilisée chez l'homme en milieu hospitalier) chez le modèle rongeur pour étudier le mode de fonctionnement et les conséquences morphologiques de l'intoxication aiguë ou chronique par des molécules psychoactives comme l'alcool et la nicotine, et ce, que ces dernières soient administrées seules ou ensemble (mode d'action du produit seul et éventuelle augmentation

des effets si plusieurs molécules). L'effet neuro-inflammatoire de ces drogues sera également étudié.

La majorité des molécules psychoactives induisent des modifications de plusieurs systèmes de neurotransmission, modifications difficilement reproductibles « *in vitro* » sur des cellules. Il est donc nécessaire d'utiliser un modèle animal ce projet étant complémentaire d'un projet en cours (étude par Tomographie d'Emission de Positons) réalisé sur le rat, ce même rongeur sera utilisé.

Le nombre d'animaux pour cette étude (80 rats), provenant d'un fournisseur agréé, a été optimisé grâce aux données de la littérature scientifique, et à des études antérieures sur l'effet de certains médicaments « *in vivo* ». Ceci nous a permis une réduction au minimum du nombre d'animaux utilisés sans compromettre la validité des expériences qui seront menées.

Les examens IRM se feront sous anesthésie gazeuse, pour éviter tout stress aux animaux. Ces derniers seront observés immédiatement après l'arrêt de l'administration des molécules psychoactives (traitement de 14 jours maximum) ou 30 jours après cet arrêt (effet à court et long terme). Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation les animaux disposent de nourriture et d'eau « *ad libitum* », le milieu est enrichi à l'aide de mouchoirs et de maison en plastique et une surveillance quotidienne de l'état de santé/stress des animaux sera assurée par du personnel qualifié. Des points limites concernant l'hébergement ou l'examen IRM ont été définis

15412 Ce projet vise à étudier *in vivo* la biocompatibilité d'un nouveau traitement de surface sur des tenons pour leur application dentaire. Le protocole d'étude suivie la norme ISO 10993-6 d'évaluation des effets biologique locale des dispositifs médicaux.

L'animal choisi pour l'étude de biocompatibilité *in vivo* est le rat (*Rattus Norvegicus*). Les tenons sont sous forme des cônes avec une longueur de 2cm et diamètre de 2mm à la base du cône. Les échantillons sont implantés sous la peau du dos du rat pour deux périodes 4 semaines et 12 semaines. Par animal sont implantés deux échantillons échantillon contrôle (sans traitement de surface) et échantillon test (avec traitement de surface). Pour la réalisation de l'étude avec les deux périodes d'observation (4 et 12 semaines) 21 animaux sont nécessaires 10 rats pour chaque période et 1 animal pour l'étude préliminaire. Un suivi post - opératoire sera réalisé pour éviter toute souffrance de l'animal. Pour diminuer son angoisse et augmenter son confort post opératoire un enrichissement sera utilisé.

Après les deux périodes implantation des observations macroscopiques et microscopiques des tissus autour des échantillons seront réalisés. Une grille d'évaluation des changements dans les tissus suivant la norme sera utilisée. La manque des changements dans les tissus autour les échantillons « test » et les échantillons « contrôles » démontrera la biocompatibilité locale de l'échantillon test.

Un suivi post - opératoire sera réalisé pour éviter toute souffrance de l'animal. Pour diminuer son angoisse et augmenter son confort post opératoire un enrichissement sera utilisé car ball Ambre (Carfil Labofood) qui réduit l'intensité de la lumière et fournit un sentiment d'invisibilité et de sûreté ainsi que TOP BRICK qui sont des modules de cœur de bois de peuplier qui permettent de développer l'activité d'exploration de l'animal et de participer à son bien-être.

Les résultats favorables de cette étude in-vivo nous rapprochera vers l'application de cette méthode de fonctionnalisation de la surface implantaire chez l'homme.

Pour respecter la règle des 3R (réduire, remplacer, raffiner) nous avons

1)réduis le nombre des échantillons/groupe en choisissant le nombre minimal des animaux déterminé par la norme ISO 10993-6 (10 échantillons test et 10 échantillons de contrôle) /période d'observation qui nous donne la possibilité d'avoir une conclusion sur la biocompatibilité des échantillons test.

2)implanté 2 échantillons/animal (en accord avec la norme ISO) – la forme et la taille de l'échantillon – cône avec une longueur de 2 cm, et diamètre de 2 mm ne permet pas l'implantation de plus des échantillons/animal pour 2 raisons

-le risque de la perte des échantillons (zone accessible par l'animal)

-une proximité importante entre les échantillons implantés qui pourra fausser les résultats.

3)déterminé les procédures chirurgicales d'implantation et de prélèvement concernant le nombre, le site d'implantation des échantillons viv-avis leurs particularités de taille et de forme lors de l'étude préliminaire.

4)réalisé des études *in vitro* concernant le type de fonctionnalisation de surface de l'échantillon « test » et choisi le type de fonctionnalisation la plus prometteuse pour son application *in vivo*.

5)prévu des conditionnements pour diminuer le stress post opératoire de l'animal

6)établis les points limites des procédures.

15413 Ce projet de recherche fondamentale vise à trouver des cibles thérapeutiques pour contrôler la fuite capillaire (fuite de plasma au travers des vaisseaux) au cours des états de choc chez l'homme.

Les états de choc constituent un enjeu de santé publique. Les admissions pour états de choc représentent un tiers des admissions en réanimation (environ 20.000 patients par an), et la mortalité associée reste de l'ordre de 40% actuellement. Il existe au cours des états de choc une fuite capillaire importante. Cette fuite capillaire est due à une augmentation de la perméabilité des vaisseaux du fait de l'activation de l'inflammation (syndrome de réponse inflammatoire systémique SRIS). Lorsqu'elle est généralisée, cette fuite capillaire aggrave l'insuffisance circulatoire du fait de la baisse du volume sanguin, et participe à l'apparition de lésions sur l'ensemble des organes (syndrome de défaillance multiviscérale). Le contrôle de la fuite capillaire s'est avéré très bénéfique dans plusieurs modèles de choc chez l'animal.

Dans un travail prospectif de recherche translationnelle entre un service de réanimation médicale et un laboratoire de recherche, nous avons identifié plusieurs protéines associées au syndrome de fuite capillaire chez 19 patients atteints de SRIS. Cette étude a permis en particulier d'identifier l'angiopoïétine-like 4, cible d'intérêt particulier du fait de son action sur les vaisseaux sanguins. Plusieurs données suggèrent un rôle protecteur de l'angiopoïétine-like 4 sur la perméabilité des vaisseaux.

Notre objectif est de fournir la preuve de concept que la modulation de l'activité de l'ANGIOPOÏËTINE-LIKE 4 permet de diminuer la fuite capillaire et la mortalité au cours du SRIS.

Nous travaillerons sur un modèle de SRIS induit chez la souris par injection de lipopolysaccharide (LPS), modèle abondamment décrit dans la littérature. Nous comparerons dans ce modèle la fuite capillaire de souris génétiquement modifiées, déficiente pour l'ANGIOPOÏËTINE-LIKE 4, avec des souris non modifiées. Nous avons évalué que 201 animaux seront nécessaires pour ce projet d'une durée totale de 5 ans.

Ce protocole a été établi en prenant en compte la règle des 3 R « Remplacer, Réduire, Raffiner »

- Le nombre d'animaux a été réduit à celui requis pour une validité statistique des résultats. Le nombre d'animaux nécessaires est calculé a priori.

- Dans un but de remplacement, des études préliminaires *in vitro* ont été réalisées. Cependant, ces conditions expérimentales ne sont pas satisfaisantes car elles ne permettent pas de reproduire les nombreuses voies physiologiques mises en jeu au cours du SRIS. La fuite capillaire est en effet d'origine multi-factorielle et l'ANGIOPOÏËTINE-LIKE 4 régule de nombreuses voies physiologiques, comme l'inflammation, l'angiogénèse ou le métabolisme lipidique. Notre projet nécessite par conséquent le recours à un modèle animal, qui intègre ces différentes composantes physiologiques.

- Enfin, nous tendrons vers les objectifs préconisés de raffinement. Ce modèle murin de fuite capillaire secondaire au SRIS est simple à mettre en place et peu invasif (une injection intrapéritonéale). Il entraîne un état de choc chez l'animal, possiblement générateur d'inconfort, contrebalancé en partie par l'effet analgésique du LPS. Par ailleurs, il est prévu une surveillance rapprochée des animaux avec administration d'antalgiques en prophylaxie et en cas de besoin selon des grilles de bien-être certifiées. Les animaux seront hébergés dans les conditions usuelles d'un établissement certifié par le ministère de la recherche et validé par la structure bien-être de l'animal constituée au sein du centre de recherches.

En conclusion, ce modèle *in vivo* permettra d'avancer dans la connaissance des mécanismes physiopathologiques de la fuite capillaire pour in fine, traiter des malades graves.

15414 Le virus respiratoire syncytial (VRS) est un des principaux pathogènes responsables d'infections respiratoires graves, et d'épidémies hivernales conduisant à de nombreuses hospitalisations. Le VRS infecte la quasi-totalité des enfants avant leurs deux ans, dont un tiers développe une bronchiolite pouvant conduire à une hospitalisation. Ce virus provoque également des maladies graves chez les personnes âgées et immunodéprimées. Si toutes les personnes adultes ont déjà été en contact avec le VRS et sont régulièrement réinfectées, l'immunité mémoire contre le virus est inefficace à long terme. Malheureusement, il n'existe aucun vaccin pour protéger contre cette infection. Seul un traitement préventif consistant en l'injection d'un anticorps monoclonal est actuellement disponible, mais son coût élevé (3000-5000 €) en limite l'utilisation aux enfants prématurés. Dans un tel contexte, la recherche de nouvelles stratégies vaccinales ainsi que de traitements antiviraux contre ce virus constitue un enjeu de santé publique.

Le présent projet a pour première ambition d'élaborer des vaccins inertes, reposant sur l'injection de protéines isolées du VRS afin d'immuniser les animaux traités. Cette stratégie vise à induire une réponse immunitaire efficace contre ce virus en stimulant la production d'anticorps neutralisants spécifiques. Il est indispensable d'évaluer nos vaccins à l'aide de modèles animaux, car la réponse immunitaire repose sur un ensemble de cellules de notre organisme, et leur capacité à circuler entre les différents organes et tissus touchés par l'infection (ici le poumon). Le second objectif de ce projet consiste à tester l'effet antiviral de molécules (peptides, nanoparticules, petites molécules, anticorps) dont l'efficacité et l'innocuité auront été préalablement validés *in vitro* sur cellules eucaryotes. L'efficacité des molécules en tant que traitement préventif ou curatif sera testée. Tester l'effet de ces molécules *in vivo* est indispensable afin d'évaluer la biodisponibilité et l'innocuité des traitements à l'échelle de l'organisme entier.

Ce projet durera 5 ans et comprendra des expérimentations sur souris. Les souris sont en effet sensibles au VRS, et constituent un bon modèle pour étudier la vaccination et le traitement par des antiviraux contre ce virus. Les essais de vaccination visent à déterminer la capacité de nos protéines à induire la production d'anticorps neutralisants et à tester l'efficacité de l'immunisation contre le VRS. Concernant les expérimentations en présence d'antiviraux, différentes stratégies antivirales ont actuellement déjà montré un effet inhibiteur contre le VRS chez la souris. A ce titre, un minimum de 20 molécules à tester est prévu. Le nombre d'animaux dans une expérience répondant à des besoins statistiques pour prouver l'efficacité du vaccin ou du traitement et à la nécessité d'inclure des groupes expérimentaux témoins non vaccinés/non traités, nous estimons que ces expériences, devant se dérouler sur 5 ans, nécessiteront un total de 2220 souris. Notre étude se divisera en 3 procédures. La première procédure dédiée à la vaccination va permettre de tester 34 formules vaccinales différentes en triplicats, soit 102 groupes de 10 animaux = 1020 souris. La procédure n°2 testera l'innocuité de 20 molécules et nécessitera l'emploi de 62 groupes de 8 animaux soit 496 souris. Enfin la procédure n°3 permettra de tester l'efficacité de ces molécules sur les souris et emploiera 88 groupes de 8 souris.

Tout au long de ces expériences, les animaux seront élevés en groupe sociaux dans des cages (5 animaux maximum dans une cage). Du papier absorbant ainsi que des tubes en carton sont ajoutés pour enrichir le milieu. Toute manipulation (injections et prélèvements à l'exception des gavages) sera systématiquement réalisée sous anesthésie. Une attention particulière sera apportée à l'emploi d'un nombre minimal d'animaux tout en maintenant des effectifs compatibles avec l'analyse bio-statistique. Notre virus a été modifié de façon à exprimer la protéine permettant de suivre de manière peu invasive la réplication virale dans l'animal vivant, à l'aide d'une caméra d'imagerie fonctionnelle IVIS. Ce virus permet de suivre l'infection au cours du temps (2 à 10 jours post-infection) par mesure de la luminescence au niveau du poumon et des voies respiratoires supérieures, limitant ainsi le nombre d'animaux impliqués dans une expérimentation. L'état de santé des animaux sera l'objet d'une attention particulière, les souris seront surveillées tout au long de l'expérience et l'état pathologique sera évalué grâce à des critères stricts basés sur la perte de poids ainsi qu'à l'établissement d'un score clinique approprié à la pathologie grippale. En cas de score clinique élevé

(souris prostrée et incapable de se nourrir et/ou ayant perdu 20 % de son poids initial), les animaux seront euthanasiés.

15415 Contexte : La greffe pulmonaire est la dernière solution thérapeutique appliquée lors d'insuffisance respiratoire grave et terminale. Cette intervention est en constante augmentation, bien que l'espérance de vie à 5 ans ne soit que d'environ 50%, avec un risque élevé de non fonctionnalité aigue de l'organe (défaillance primaire du greffon ou DPG) qui concerne environ 30% des patients dans les trois jours après greffe. Cette défaillance de l'organe conduit trop fréquemment au décès du receveur (entre 30 et 50% des cas) par des difficultés respiratoires aiguës et elle prédispose aux rejets des survivants. Les mécanismes de la DPG sont complexes. En effet, lors du prélèvement de l'organe sur le donneur, sa préparation, son transport et son implantation sur le receveur, les cellules du greffon connaissent une période de carence en oxygène (ischémie). Paradoxalement, lorsque le sang du receveur recircule dans l'organe transplanté (reperfusion), l'apport brutal d'oxygène conduit à une surproduction de molécules néfastes pour l'organisme. De plus, le stress induit par l'acte chirurgical sur le receveur ajoute une composante inflammatoire importante et amplifie cette réponse délétère.

Objectif : Pour limiter les lésions induites par la carence en oxygène et l'afflux de molécules néfastes après la remise en circulation, nous proposons de développer une stratégie de circulation croisée qui consiste à perfuser le greffon pulmonaire avec le sang du receveur avant la transplantation. Nous utiliserons le modèle préclinique porcin qui est le modèle le plus pertinent en recherche dans ce domaine et nous brancherons le poumon donneur sur le système veineux du receveur en circulation extracorporelle. Cette procédure étant faite sans acte chirurgical invasif sur le receveur, elle permettra aux cellules immunitaires du receveur d'infiltrer le greffon dans un contexte optimal, limitant la réponse délétère. De plus nous proposons de traiter le poumon donneur avec des cellules souches de la moelle osseuse qui sont connues pour induire des réponses anti-inflammatoires durables dans les cellules immunitaires avant le début de la circulation croisée. Ainsi les cellules souches conditionneront les cellules immunitaires résidentes du greffon et celles du receveur pendant la circulation croisée, afin de réduire la réponse inflammatoire néfaste. Nous testerons ces hypothèses sur les poumons isolés et perfusés en circulation croisée en deux phases i) mise en place de la technique chirurgicale et identification dans le temps des types de cellules infiltrant le greffon (10 animaux) ii) Essais de 5 méthodes différentes de traitement des cellules souches pour reconditionner les cellules immunes du greffon et du receveur (70 animaux). La phase 2 sera conduite uniquement si la phase 1 est satisfaisante (succès de la mise en place technique). Il n'y a pas de transplantation dans cette demande. Une autre demande d'autorisation de projet impliquant de la transplantation sera faite ultérieurement, si une ou des méthodes de traitement des cellules souches mises en essai dans cette demande sont convaincantes.

Bénéfices scientifiques : Ce projet permettra d'identifier les différents types cellulaires infiltrant le poumon au premier temps de la mise en route de la circulation croisée dans le greffon ainsi que des mécanismes de régulation immunologiques induits par les cellules souches et leurs impacts sur le phénomène délétère lors de la remise en circulation du greffon.

Bénéfices sociétal et médical : Les bénéfices médicaux seront considérables en effet, le projet montrera l'efficacité de la circulation croisée et le bénéfice du conditionnement par les cellules souches, pour limiter la réponse aux effets délétères de la carence en oxygène et de l'afflux de molécules néfastes après la remise en circulation du greffon dans le modèle porc, qui est le modèle préclinique animal le plus pertinent pour une translation rapide chez l'homme. Comme les techniques de circulation extracorporelle ambulatoire sont maîtrisées en clinique humaine, on n'anticipe pas de difficulté particulière à sa mise en œuvre.

Principe des 3 R

Remplacer : il n'est pas possible de reproduire ces phénomènes de carence en oxygène et d'afflux de molécules néfastes *in vitro*, car il s'agit d'une réponse globale et complexe, faisant intervenir de multiples paramètres cellulaires et différents organes (poumon, système cardio-vasculaire, système immunitaire, hormones...). L'étude des propriétés de régulation immunologique des cellules

souches a été faite principalement *in vitro* dans la littérature et elles doivent maintenant être testées dans la complexité d'un organisme.

Réduire : la conduite du projet nécessite au maximum 80 porcs (Large White, 50-60 kg), sera arrêté en cas d'échec à la phase 1 et tout sera mis en œuvre pour réduire le nombre d'animaux.

Raffiner : Les animaux avant la circulation croisée seront hébergés dans des loges par groupes de deux à quatre, le milieu sera enrichi par des chaînes et des ballons. Les porcs lors de la circulation croisée seront maintenus anesthésiés pendant toute la durée de l'expérience et ne seront pas réveillés. Ils recevront un antidouleur durant toute l'anesthésie.

15416 Malgré un traitement par irradiation aux rayons-X, le traitement des métastases cérébrales reste malheureusement à caractère palliatif puisqu'il consiste en une prise en charge non spécifique. La problématique réside donc dans la nécessité d'apporter un traitement plus spécifique des métastases cérébrales en tenant compte notamment de l'hétérogénéité interpatient. Il serait donc intéressant d'évaluer le potentiel thérapeutique d'une adaptation des protocoles de radiothérapie en fonction des paramètres biologiques de la tumeur. Un des paramètres biologiques important dans la réponse thérapeutique est l'hypoxie. En effet, celle-ci est connue pour induire une résistance des cellules tumorales à la radiothérapie. Dans des résultats précédents sur des modèles précliniques de métastases cérébrales, nous avons vu qu'il existe une hétérogénéité en terme d'hypoxie entre deux métastases au sein d'un même cerveau. En effet, pour un même nombre de cellules tumorales injectées au même moment, une tumeur corticale deviendra hypoxique et une au niveau du striatum ne le deviendra pas. Cela suppose qu'il existe des mécanismes biologiques différents entre les deux localisations des métastases cérébrales qui pourraient être utilisés comme cibles thérapeutiques ou pour une radio-sensibilisation des métastases hypoxiques. Nous avons ainsi observé que les métastases corticales hypoxiques présentent une forte concentration d'espèces réactives liées au stress oxydatif. Notre hypothèse est ici qu'un composé permettant de diminuer ces espèces réactives pourrait diminuer l'agressivité des métastases corticales hypoxiques et ainsi agir comme radio-sensibilisant, notamment en diminuant l'hypoxie tumorale. Le laboratoire possède une molécule mimant l'activité des superoxydes dismutases (SOD) qui ont un rôle majeur dans l'élimination des espèces réactives. Cette molécule sous potentiel brevet ne peut être dénommée dans ce document et sera mentionné en aval de ce document en tant que molécule « SOD-like »

Nous proposons donc dans ce projet au niveau préclinique, d'étudier l'intérêt de cette molécule SOD-like pour radio-sensibiliser les métastases hypoxiques. Ceci permettrait de diminuer la dose de radiothérapie nécessaire pour détruire la tumeur et ainsi diminuer les dommages au tissu sain environnant. Pour ce projet, le modèle d'étude sera le rat immunodéprimé. Pour le modèle de métastases cérébrales, des cellules de métastases cérébrales humaines seront injectées au niveau du cortex et du striatum du cerveau de rat. Ce modèle est bien validé au sein du laboratoire. La caractérisation de l'effet du SOD-like sur la composante hypoxique se fera via l'imagerie TEP et IRM et immunohistologie ainsi que par le dosage des espèces réactives. La caractérisation de l'efficacité de traitement en imagerie se fera par un suivi hebdomadaire du volume tumoral en imagerie IRM et sera combinée à une étude de survie ainsi qu'à des études immunohistologiques. Concernant l'aspect « remplacement », ce projet ne peut pas s'effectuer sur des modèles de remplacement *in vitro* ou *in silico* car les tumeurs sont connues pour être multicompartimentales, c'est-à-dire qu'au-delà du simple compartiment de la cellule tumorale existent la vascularisation ou l'hypoxie comme mentionnée précédemment. L'utilisation des modèles *in vivo* complets intégrant tous les compartiments des tumeurs cérébrales ainsi que le fonctionnement global de l'organisme reste indispensable. Le choix d'animaux immunodéprimés (rats nude) pour notre projet, se justifie par l'utilisation de cellules humaines de métastases cérébrales.

Ce projet utilisera l'imagerie biomédicale et notamment la TEP c'est pourquoi elle sera réalisée sur des rats au regard de la faible résolution spatiale de la TEP peu compatible avec l'imagerie du cerveau de souris. Enfin, l'utilisation des méthodes d'imagerie non invasive se conforme à la réglementation en vigueur dans le respect de la réduction du nombre d'animaux car permettant de suivre à différents temps l'évolution de la tumeur. Enfin, concernant l'aspect « raffinement », les

différents protocoles ont été pensés de manière à limiter au maximum la souffrance animale et ainsi augmenter le bien-être animal avec par exemple des applications de xylocaïne après l'acte chirurgical ou l'utilisation d'anesthésie pour les acquisitions d'imagerie médicale afin d'éviter un maximum le stress de l'animal.

L'utilisation de l'imagerie multimodale apporte un gain important en terme de réduction du nombre d'animaux puisqu'elle permet un suivi longitudinal.

Le nombre total d'animaux pour ce projet est de 240.

15417 Le cancer du pancréas est reconnu comme l'un des cancers les plus agressifs dans le monde. L'adénocarcinome pancréatique ductal (PDAC) est le plus répandu des cancers du pancréas. Il représente 85% des cancers de ce type, et possède un mauvais pronostic du fait d'un diagnostic souvent tardif, à un moment où la tumeur produit des métastases. L'espérance de vie moyenne est de 5 ans après diagnostic ce qui représente le taux le plus faible de survie (5%) de l'ensemble des cancers. Les patients sont traités par chirurgie et chimiothérapie, traitements à ce jour insuffisamment efficaces.

Malgré le développement de nouvelles thérapies anti-tumorales (nouvelles molécules de chimiothérapie, radiothérapie, immunothérapies, thérapies ciblées), la structure particulière du microenvironnement tumoral rend les PDAC peu accessibles à ces thérapies. En effet, les PDAC sont par exemple caractérisés par un défaut de distribution des médicaments dans la tumeur et une non-réponse aux immunothérapies, le tout lié à une vascularisation anarchique de ces tumeurs.

L'objectif de ce projet est double puisqu'il vise d'une part à cibler les vaisseaux sanguins tumoraux tout en développant une nouvelle immunothérapie qui sera alors administrée dans un environnement propice à son action.

Pour cela, nous avons développé des molécules qui rétablissent un réseau vasculaire tumoral physiologiquement normal et favorisent la distribution des molécules thérapeutiques à la tumeur. Nous souhaitons les combiner avec des immunothérapies et étudier leurs effets potentiellement inhibiteurs sur la croissance des tumeurs pancréatiques. Ces molécules seront testées sur des souris. Nous allons induire le développement de cellules tumorales dans le pancréas, et suivre leur évolution en présence de différentes molécules d'intérêt, seules et en combinaison.

Dans ce projet, nous envisageons d'utiliser 1076 souris. Toutes les mesures ont été prises afin de diminuer le nombre d'animaux pour cette étude. En effet, au laboratoire nous avons développé des modèles de croissance tumorale en organoïdes (culture cellulaire en trois dimension) pour remplacer les modèles animaux. Ces modèles *in vitro* nous permettent de tester les effets de molécules qui ciblent les cellules cancéreuses et ainsi de faire un premier criblage des inhibiteurs et des protocoles. Nous avons également réduit le nombre d'animaux grâce aux informations obtenues avec des expériences menées *in vitro*. Cependant les traitements d'immunothérapies ciblent le système immunitaire et le microenvironnement tumoral et ne peuvent pas être testés *in vitro* d'une manière efficace et prédictive sur ces deux aspects en même temps. Afin de limiter la souffrance animale, nous avons établi des points limites pour chaque procédure. Un examen clinique des animaux sera effectué quotidiennement. Tout signe témoignant d'une mauvaise tolérance au traitement « perte de poids, souffrance, apathie, déshydratation » des animaux conduira à l'interruption des expérimentations en cours.

15418 L'implant cochléaire est l'ultime méthode de réhabilitation de l'audition de la personne malentendante en échec de toute autre thérapeutique. La pose de cet implant nécessite l'insertion d'électrodes dans l'oreille interne. Le caractère traumatique de cette insertion peut être à l'origine d'une cicatrice, appelée fibrose, délétère pour le fonctionnement de l'implant. A ce jour, les mécanismes de développement de cette fibrose sont inconnus. Nous proposons dans ce projet d'étudier chez l'animal les mécanismes impliqués dans le développement de cette fibrose après implantation cochléaire afin d'identifier les traitements possibles.

Le but de ce projet est d'induire une fibrose dans l'oreille interne par l'implantation chronique d'une électrode (reproduisant ainsi le modèle de l'implant cochléaire humain), puis de prélever les oreilles

internes à différents temps suivant l'implantation pour analyser la présence de marqueurs liés à la fibrose. Deux traitements expérimentaux seront administrés aux animaux pour évaluer leur efficacité sur la prévention de la fibrose.

Il n'existe pas de modèle *in vitro* permettant d'évaluer de manière fidèle la production de fibrose après implantation. Cependant un modèle *in vitro* développé par l'équipe a permis de sélectionner 2 traitements candidats ainsi que leurs concentrations optimales sans avoir à recourir à des animaux vivants.

Afin de valider ces hypothèses, nous souhaitons tester ces 2 drogues chez le rat vivant après chirurgie d'implantation cochléaire. La présélection réalisée par les expériences *in vitro* nous permettra de limiter au minimum le nombre d'animaux vivants à traiter. La chirurgie sera réalisée par un expérimentateur habilité pour la chirurgie animale et expert en implantation cochléaire chez l'homme. L'intervention chirurgicale nécessaire à l'implantation chronique de l'électrode cochléaire sera réalisée sous anesthésie générale. Un suivi quotidien des animaux opérés sera mis en place durant tout le temps de l'expérimentation. En dehors des périodes d'isolement pré- et post-opératoires, les animaux seront hébergés dans un milieu enrichi, (copeaux, huttes PVC, briques de bois). L'ensemble du présent projet utilisera un nombre maximum de 90 rats.

A la fin de la période expérimentale, les animaux seront euthanasiés après anesthésie profonde à plusieurs intervalles de temps suivant la chirurgie et les traitements. L'expression des marqueurs liés à la fibrose sera recherchée dans les échantillons pour évaluer l'efficacité des traitements.

15419 L'obésité est aujourd'hui un vrai problème de santé publique dans tous les pays industrialisés (2,5 millions de morts par an dans le monde). La chirurgie de l'obésité est actuellement le seul traitement permettant à la fois la perte de poids et l'amélioration des anomalies métaboliques (diabète,) chez les patients obèses, réfractaires aux régimes et à l'activité physique. La technique la plus efficace à ce jour est le court-circuit gastrique (Gastric By-pass), intervention réalisée par voie chirurgicale, si possible laparoscopique. Il s'agit d'une procédure chirurgicale lourde pouvant être suivie de complications graves voire de mortalité.

Des techniques endoscopiques, basées sur le principe du bypass, sont en cours de développement. Le but de ce travail est d'étudier l'efficacité de dispositifs médicaux permettant la réalisation de by-pass purement endoscopique.

La règle des 3 R est largement prise en compte puisque

- Le modèle animal a été réservé à la validation définitive des dispositifs, après des essais sur banc d'essai. En outre, les animaux seront utilisés pour valider deux dispositifs en même temps
- Le modèle animal de grande taille (modèle porcin) permet, dans des conditions proches de la pratique humaine, de valider ces essais avant l'utilisation chez l'homme (exigence ANSM et FDA).
- Il s'agit de procédures endoscopiques standard pour lesquelles une anesthésie et une analgésie (per et postopératoire) adaptées sont utilisées. La souffrance animale est donc réduite au maximum. Les animaux sont stabulés au maximum cinq jours en amont de ces procédures, dans un milieu enrichi comme exigé par la réglementation animale (balle, cordes, jouets non dangereux notamment du risque d'inhalation et/ou d'ingestion).
- Le nombre d'animaux par groupe sera de trois, nombre minimum pour atteindre une significativité des variations attendues des mesures physiques et biologiques
- Le nombre total d'animaux sera de six (2 groupes de 3)

15420 La piroplasmose équine, présente sur l'ensemble du territoire français, est une maladie parasitaire due à deux agents *Babesia caballi* et *Theileria equi*. Dans le monde, 21 espèces de tiques dures peuvent être impliquées dans la transmission de ces parasites et appartiennent aux genres *Dermacentor*, *Rhipicephalus* et *Hyalomma*. Sous sa forme aigue, la maladie se caractérise par de la fièvre, de l'anémie, de l'œdème des membres et par des problèmes de foie. Nombre d'équidés porteurs asymptomatiques correspondent à des réservoirs de parasites susceptibles de disséminer la maladie, et peuvent développer une forme clinique lors d'un stress ou suite à un effort intense.

Toutes les catégories de chevaux ayant accès à des pâtures peuvent être atteintes par la piroplasmose équine. En France, les parasites de la piroplasmose équine sont essentiellement transmis par *D. reticulatus* et *D. marginatus* et des séroprévalences pouvant aller jusqu'à 60% ont été rapportées lors d'études ponctuelles.

Dans ce contexte se pose la question qui fait l'objet du présent projet, de la détermination des facteurs de risque associés à la piroplasmose équine au sein des chevaux de trait en France, afin de proposer des moyens de prévention pour minimiser ou supprimer les risques d'infection des chevaux et pérenniser les différents marchés d'exportation. Cette étude s'attellera à définir des facteurs à la fois individuels, environnementaux, et liés aux pratiques d'élevage. Pour cela, une enquête en élevage sera mise en œuvre dans les régions plusieurs races de trait sont présentes et dans laquelle il y a de nombreux élevages de chevaux. Des données concernant les caractéristiques environnementales de chacune des pâtures fréquentées par le cheval seront recensées, et des collectes de tiques seront réalisées sur ces pâtures et directement sur les chevaux. Les deux parasites *B. caballi* et *T. equi* seront alors recherchés dans ces tiques pour évaluer l'exposition des chevaux. Des informations concernant les chevaux sélectionnés dans l'étude seront collectées caractéristiques individuelles (race, sexe, âge), historique de traitements, parcours de l'animal dans les pâtures de l'élevage, recherche sérologique d'anticorps et de la présence des parasites *B. caballi* et *T. equi* suite à des prélèvements sanguins réalisés à la jugulaire.

165 chevaux d'élevage seront prélevés dans le cadre de ce projet, afin de relier le statut sérologique/d'infection ou l'infestation des chevaux sélectionnés avec leurs caractéristiques individuelles, les pratiques de pâturage les concernant et les caractéristiques paysagères des pâtures.

Le cheval étant l'espèce cible de la maladie, il n'est pas possible d'utiliser une autre espèce ou de transposer les résultats connus dans d'autres espèces. Les chevaux seront recrutés dans des élevages et l'expérimentation se limitera à des gestes cliniques rapides et peu invasifs (prise de sang et "détiquage") qui seront pratiqués par une vétérinaire expérimentée. Bien que le prélèvement sanguin ne représente pas un geste très traumatisant pour l'animal et que les chevaux sont des animaux habituellement facilement manipulables, afin de limiter toute réaction de stress, l'éleveur qui le connaît sera sollicité pour la contention, l'animal sera laissé dans son environnement naturel pour le prélèvement (sa pâture) et si cela s'avère nécessaire, un pli de peau sera effectué sur une autre partie du corps pour détourner son attention lors de la piqûre. Les chevaux se verront remettre une récompense pour leur participation à ce projet.

Les chevaux reprendront ensuite leur vie « normale ». Les résultats obtenus auront une application directe pour les éleveurs en permettant d'identifier les facteurs de risque d'infection parasitaire, et d'émettre des recommandations permettant d'agir directement sur ces facteurs via par exemple des mesures de biosécurité et/ou de changement de pratiques d'élevage et amélioreront de ce fait les conditions de vie de l'espèce.

15421 La maladie inflammatoire de l'intestin (MICI) représente un groupe de maladies inflammatoires récurrentes chroniques du tractus digestif particulièrement handicapantes, et incurables actuellement. L'étiologie exacte des MICI reste inconnue mais plusieurs facteurs tels que la microflore intestinale, l'environnement externe et la susceptibilité génétique, jouent un rôle dans la pathogenèse des MICI. Les symptômes cliniques des MICI peuvent varier de légers à graves. De plus, l'évolution de la maladie peut varier avec le temps, alternant des périodes de rémission et d'autres avec de graves crises invalidantes avec de potentielles complications médicales et chirurgicales. Des traitements médicaux particuliers peuvent être proposés, comme les anticorps anti-TNF α (Infliximab), mais ils sont coûteux et leur efficacité est variable, seul un patient sur trois étant réellement répondeur. Par conséquent, une méthode robuste d'évaluation du niveau d'expression de TNF- α pouvant prédire une réponse à long terme aux inhibiteurs du TNF- α serait souhaitable.

Nous avons émis l'hypothèse que la quantification par Tomographie par Emission de Positions (TEP) de la captation colique d'un médicament anti-TNF- α marqué par un produit radioactif, pourrait

permettre de renseigner sur l'importance de l'expression du TNF- α , dans les segments coliques inflammatoires et ainsi, d'aider à prédire la réponse à ce traitement. La possibilité d'une telle prédiction a déjà été montrée en utilisant des anticorps anti-TNF- α fluorescents chez les patients, mais avec les limites inhérentes à la difficile quantification du signal fluorescent par des techniques endoscopiques. L'imagerie TEP n'a pas de telles limites et une méthode générique pour le marquage d'anticorps par un produit radioactif le Zirconium-89 [^{89}Zr], a déjà été développée. C'est pourquoi, nous proposons un programme d'étude préclinique sur l'imagerie TEP d'anticorps anti-TNF- α (Infliximab) marqué par le [^{89}Zr] chez le rat, une espèce animale pour laquelle l'efficacité de cet anticorps a déjà été démontrée. Nous avons choisi comme modèle expérimental « le modèle DSS » (Dextran Sulfate Sodium) qui induit par l'administration de DSS dans l'eau de boisson une colite aiguë ou chronique (selon la durée de l'administration et sa répétition) symptomatiquement et morphologiquement comparable à la colite ulcéreuse humaine.

Le programme de cette étude sera réalisé en 3 étapes

- Une 1ère étape servira à analyser la fixation de l'anticorps radioactif chez 20 rats normaux celle-ci sera directement dépendante de la taille de l'infliximab et la période de décroissance radioactive du [^{89}Zr] et permettra de définir la période de fixation maximale pour la réalisation des examens TEP au [^{89}Zr]-Infliximab (H0, J1, J2, J3, J4 ou J7 après l'injection de l'anticorps radioactif).

- Une 2e partie aura pour objectif de quantifier l'étendue de l'inflammation chez le rat, durant la progression de la maladie en passant par l'inflammation aiguë, subaiguë à chronique par la réalisation d'un examen TEP de référence en médecine nucléaire, dans ce type de pathologie. Durant cette 2e partie, en utilisant 3 groupes de 11 rats chacun traités ou non par DSS, et qui seront suivi durant 15 jours de chaque cycle, nous définirons le pic inflammatoire optimal pour injecter l'anticorps radioactif. Durant cette étape, 3 prélèvements sanguins par l'artère caudale, seront réalisés avant induction de la colite, puis à différents temps post induction de la colite de J6 à J15 (n= 2 à 3) par temps en respectant un délai de 7 jours entre chaque prélèvement et ceci pour chaque cycle de DSS, ces prélèvements sanguins seront réalisés selon la réglementation éthique de l'expérimentation animale et serviront à mesurer le taux sanguin du TNF- α , les marqueurs de l'inflammation.

Enfin, en combinant les résultats des 2 premières étapes de l'étude, nous serons en mesure d'injecter l'anticorps radioactif au bon timing de sa fixation physiologique et durant le pic de l'inflammation aiguë, subaiguë et chronique. Cette dernière étape de suivi de la fixation de l'anticorps radioactif sera effectuée chez 34 rats traités et non traités. Pour la 3e procédure, seul 2 prélèvements sanguins par l'artère caudale, seront réalisés avant induction de la colite, puis le jour du pic de l'inflammation défini d'après les résultats de la 2e procédure et ceci pour chaque cycle de DSS tout en respectant le délai éthique de prélèvements sanguins défini selon la réglementation de l'expérimentation animale. Durant les 3 étapes du projet, un total de 87 rats sera nécessaire pour répondre à nos questions. A la fin de cette étude, nous serons en mesure de proposer un test de diagnostic prédictif de la réponse à l'infliximab lors d'une colite ulcéreuse, ce qui permettra d'éviter un traitement thérapeutique inefficace à des patients non répondeurs et de réduire les coûts des traitements de cette pathologie en adaptant les traitements thérapeutiques au patient (médecine personnalisée).

Remplacement L'analyse objective de l'évolution de l'inflammation dans le cas d'une rectocolite hémorragique et de la biodistribution de nouveau radiotraceur ([^{89}Zr]-Infliximab) ne peut être réalisée que sur un modèle animal permettant par la suite d'analyser le mécanisme physiologique global à l'image des examens chez l'Homme ce qui permettra de mieux coller à la réalité lors de l'administration de ce traitement thérapeutique.

Réduction les mêmes animaux seront suivis avant induction de la colite et durant l'évolution des cycles d'inflammation aiguë, subaiguë et chronique ce qui permettra de réduire au maximum le nombre d'animaux à inclure.

Raffinement Durant tous les cycles inflammatoires par lesquels l'animal va passer, les animaux seront pesés et surveillés quotidiennement, les quantités d'eau et de nourriture ingérées seront mesurées. La surveillance quotidienne des animaux aura lieu à l'animalerie dans un environnement

sécurisant pour l'animal. Les examens *in vivo* seront réalisés sous anesthésie générale. De plus, un score DAI (validé par plusieurs études sur l'animal) quantifiant l'apparition et l'évolution des symptômes cliniques sera établi. Ceci permettra d'évaluer l'état de l'animal et pallier à le soulager au maximum par administration de buprénorphine ou une mise à mort si l'animal présente une perte de poids > à 20% ou des symptômes cliniques impossibles à soulager

15422 Les traumatismes graves sont la première cause de décès dans le monde des sujets jeunes. Les deux principales causes de décès sont le traumatisme neurologique catastrophique et le choc hémorragique. Le choc hémorragique est caractérisé par une perte brutale de sang qui compromet l'apport en nutriments et en oxygène aux organes. Le choc hémorragique isolé entraîne 30% de décès dont la moitié survient dans les 2 heures de prise en charge. Les traumatismes sévères à l'origine du choc hémorragique entraînent également des lésions tissulaires et le tout conduit au développement de défaillances d'organes sévères.

Les mécanismes impliqués sont assez divers hypotension (baisse de pression artérielle), hypoxémie (baisse de l'oxygène dans le sang), anémie (perte d'hémoglobine, transporteur d'oxygène), bas débit cardiaque, défaillance microcirculatoire (défaillance de perfusion des vaisseaux sanguins de moins de 150µm de diamètre), lésions tissulaire diverses (destruction des cellules et relargage de produits de dégradation toxiques), endothéliopathie (altération de la paroi interne des vaisseaux) et coagulopathie (défaillance de la coagulation).

La rhabdomyolyse se définit par une rupture de l'intégrité des cellules musculaires striées squelettiques, responsable de la fuite du contenu intracellulaire dans la circulation générale. L'insuffisance rénale aiguë est une complication sévère et fréquente de la rhabdomyolyse. Parmi l'ensemble des mécanismes impliqués, la vasoconstriction rénale est un élément important, responsable d'une hypoperfusion rénale. La survenue d'une insuffisance rénale aiguë au cours d'une hospitalisation est un facteur de risque indépendant de mortalité hospitalière et expose au risque d'insuffisance rénale chronique.

Dans notre pratique clinique en traumatologie sévère, la rhabdomyolyse est fréquemment associée à une hémorragie sévère. Une des défaillances d'organes les plus sévère, l'insuffisance rénale aiguë (nécessité de réanimation prolongée, de dialyse et séquelles définitives pour les cas les plus graves) est particulièrement associée aux traumatisés les plus graves présentant un choc hémorragique et une rhabdomyolyse.

Dans des travaux récents portant sur les patients victimes de choc hémorragique traumatique, nous avons identifié comme facteurs associés au développement d'une insuffisance rénale aiguë sévère la quantité de transfusions et la survenue d'une rhabdomyolyse.

Ce travail est la suite d'une première étude chez le porc ayant porté sur les effets rénaux de l'association choc hémorragique et rhabdomyolyse. Nous avons observé une synergie lésionnelle qui induisait une défaillance multiviscérale et une mortalité très précoce. Les effets observés correspondent au tableau des blessés qui arrivent vivants à l'hôpital grâce à une intensification de la réanimation pré-hospitalière mais qui meurent dès les premières 24 heures de défaillance multiviscérale.

Dans cette nouvelle étude, la réanimation sera intensifiée de manière à reproduire une prise en charge optimale en réanimation avec des suppléances d'organes.

Le modèle est particulièrement adapté à l'étude de paramètres multiples avec un animal dont les caractéristiques hémodynamiques sont proches de l'homme. Ces travaux n'ont pas été réalisés d'après la littérature.

L'objectif de ce projet est de caractériser et de prévenir les lésions d'organes, en particulier les lésions rénales provoquées par une double agression reproduisant les mécanismes lésionnels des traumatismes graves associant choc hémorragique et rhabdomyolyse chez le porc réanimé.

Nous évaluerons donc la fonction et la perfusion rénale au cours de la phase aiguë de l'agression rénale c'est à dire pendant les 48 premières heures post-agression.

Les conséquences physiologiques du choc seront étudiées de manière multiparamétrique mesure dynamique continue du lactate et de sa clairance, mesure du débit cardiaque, mesure de la microcirculation intestinale et sublinguale, mesure de l'oxygénation tissulaire intestinale et mesure de l'oxygénation, de la perfusion et de la fonction rénale.

Actuellement, il n'existe aucune méthode *in vitro* permettant de répondre à notre objectif. Cependant, d'après la littérature, 8 animaux par groupe sont suffisants pour valider une différence d'atteinte rénale entre un groupe sain et un groupe ayant subi une rhabdomyolyse, c'est pourquoi dans un souci de réduction du nombre d'animaux, nous arrêterons l'expérimentation dès l'inclusion de 8 porcs par groupe. Cette mesure pourrait épargner l'utilisation de 12 porcs.

L'ensemble de cette procédure sera réalisé sous anesthésie générale par un mélange couvrant les composantes hypnotiques et antalgiques de l'anesthésie. Nous avons utilisé des techniques d'analgésie post-opératoires afin d'optimiser l'analgésie en plus des traitements habituels.

Nous utiliserons dans cette étude au maximum 80 porcs qui seront stabulés par groupe de deux dans des cages de 2m² lors de la période d'acclimatation (individus de poids de 50kg) pour permettre un contact régulier entre congénères et réduire ainsi les stress.

Afin de tenir compte des besoins quotidiens de nos animaux et d'améliorer leur bien-être, leur environnement sera enrichi (activité de foussement encouragée, médecine ball, jeux dans le couloir, planche à gratter, distributeur d'aliment actif).

15423 L'embolie pulmonaire avec défaillance circulatoire est une maladie grave avec une mortalité élevée de l'ordre de 40% à la phase aigüe.

Elle est la conséquence d'une défaillance cardiaque aiguë secondaire à une obstruction des vaisseaux pulmonaires par un caillot de sang. La désobstruction des vaisseaux pulmonaires est donc un des objectifs principaux du traitement.

La thrombolyse systémique correspond à l'injection intraveineuse de médicaments visant à dissoudre le caillot de sang et reste le traitement de référence, mais ne peut être mise en œuvre chez tous les patients en raison de nombreuses contre-indications.

L'embolectomie pulmonaire chirurgicale est le traitement de seconde intention consistant à retirer le caillot de sang par une chirurgie à thorax ouvert. Elle est associée à une mortalité élevée et ne peut être réalisée dans tous les centres car elle nécessite une expertise particulière qui n'est pas disponible partout.

La thrombectomie per cutanée par cathéter est une technique qui permet la destruction du caillot de sang via un dispositif souple et peu invasif que l'on introduit par une veine périphérique et que l'on monte jusqu'au vaisseau pulmonaire obstrué.

Elle représente une alternative prometteuse et plus facilement accessible mais reste encore mal évaluée à ce jour.

Nous proposons donc d'évaluer l'efficacité de la désobstruction des vaisseaux pulmonaires par un cathéter sur l'amélioration de la fonction du cœur et de la circulation sanguine dans un modèle d'embolie pulmonaire grave proximale (proche de l'origine du vaisseau pulmonaire, là où un caillot de sang est plus facilement accessible). Nous souhaitons démontrer que l'embolectomie par cathéter améliore la fonction du cœur évaluée sur différents paramètres.

Elle permettra également d'obtenir des données originales sur l'effet du mécanisme utilisé pour la thrombectomie sur la fonction du cœur en l'absence d'obstruction et de mettre en évidence d'éventuels effets secondaires liés à l'utilisation du dispositif.

Si des effets bénéfiques sont démontrés, ils permettront d'envisager la réalisation d'études prospectives chez les patients souffrant d'embolie pulmonaire grave afin d'évaluer l'efficacité et la sécurité de ces dispositifs.

Notre projet prévoit d'utiliser un modèle expérimental porcin car il n'existe actuellement pas de méthodes alternatives (simulation sur mannequin haute-fidélité, simulation numérique) permettant de modéliser les effets physiologiques d'une embolie pulmonaire avec défaillance circulatoire. Au total, un maximum de 10 porcs est prévu pour ce projet.

Le porc est le modèle animal approprié pour cette étude étant données ses caractéristiques anatomiques et physiologiques proches de l'homme.

Par ailleurs les moyens d'investigations hémodynamiques et fonctionnels (cathétérisme cardiaque, échocardiographie) utilisés chez les patients sont directement applicables sur cette espèce animale. L'ensemble des procédures expérimentales seront réalisées sous anesthésie générale au décours de laquelle l'animal sera euthanasié. A aucun moment l'animal ne sera conscient ni susceptible de ressentir la douleur.

Après une première étape de conception et de validation du modèle expérimental d'embolie pulmonaire grave avec défaillance circulatoire, une deuxième étape consistera en l'évaluation de la désobstruction pulmonaire par le cathéter de thrombectomie.

Afin de réduire le nombre d'animaux nécessaire, chaque animal sera son propre témoin.

Pour améliorer le confort et le bien-être des animaux, les animaux seront hébergés dans l'animalerie une semaine avant l'intervention afin de respecter une période d'acclimatation. Ils seront gardés parmi leurs congénères pour réduire leur stress, à raison de deux par box. Du personnel animalier mettra quotidiennement à disposition un environnement stimulant (activité de fouissage, distributeur d'aliments, planche à gratter).

15424 Ce projet a comme but principal d'étudier les mécanismes neurobiologiques impliqués dans l'addiction et le risque persistant de rechute. L'addiction est un trouble mental caractérisé par la prise compulsive de drogue qui persiste malgré des conséquences négatives. Quelques études suggèrent qu'une dérégulation du métabolisme du cholestérol jouerait un rôle dans l'addiction, et plus particulièrement que l'expression de protéines impliquées dans ce métabolisme serait modifiée aussi bien chez l'Homme, que dans des modèles animaux d'addiction, en réponse à la cocaïne ou à l'alcool. Notre hypothèse de travail est qu'une dérégulation du métabolisme du cholestérol serait impliquée dans le phénomène d'addiction et qu'en modulant les taux de cholestérol cérébraux, il serait possible de reverser les « empreintes » laissées durablement par les drogues dans le cerveau et responsables de l'addiction.

Pour tester notre hypothèse, nous utiliserons plusieurs modèles d'addiction (sensibilisation comportementale et auto-administration de cocaïne et d'alcool) et nous allons les coupler à des approches virales pour moduler l'expression d'une protéine impliquée dans la dégradation du cholestérol (=CYP46A1) dans 2 régions cérébrales spécifiquement (le striatum dorsal et l'amygdale) et mesurer l'impact de ces modulations sur l'addiction.

Afin de caractériser l'implication du métabolisme du cholestérol dans l'addiction, nous déterminerons 1) si la modulation du métabolisme du cholestérol avant toute exposition aux drogues impacte la mise en place d'une addiction et les adaptations durables impliquées; 2) si la modulation du métabolisme du cholestérol chez des rats abstinents après une phase d'auto-administration de cocaïne ou d'alcool peut modifier le comportement de recherche de drogues. En effet, l'un des problèmes majeurs dans le traitement de l'addiction est la prévention des rechutes qui peuvent être observées après une longue période d'abstinence.

Dans ce projet, nous avons pris en considération la règle des 3Rs (remplacer, réduire et raffiner). Ce type de recherche, visant à comprendre les bases d'une maladie psychiatrique telle que l'addiction, ne peut être menée que sur un animal vivant (remplacer). Nous minimiserons le nombre d'animaux utilisés par des méthodes expérimentales validées et reproductibles. Et nous utiliserons des méthodes statistiques appropriées de type ANOVA qui nous permettront de faire des comparaisons multiples et de limiter le nombre d'animaux utilisés (réduire). Les animaux subissant une chirurgie seront traités pour de possibles douleurs postopératoires (raffiner). Nous avons calculé que pour cette étude 960 rats seront nécessaires pour obtenir des données analysables statistiquement.

Cette recherche est innovante et a le potentiel de fournir des informations critiques pour la compréhension de l'addiction, informations qui peuvent amener à une meilleure prise en charge de cette maladie chez l'homme.

15425 La France est le premier marché de nutrition infantile en Europe, bénéficiant d'une image positive de la qualité de ses produits laitiers à l'international. Les nourrissons français reçoivent en majorité des formules infantiles, qui contrairement à la tendance du marché en quête de produits peu transformés, sont des produits subissant de nombreux traitements de transformation. Les traitements thermiques peuvent dénaturer les protéines et impacter les propriétés nutritionnelles des formules infantiles. Dans ce contexte, un projet de recherche académique a développé des formules infantiles de nouvelle génération basées sur des opérations simples de filtration de lait frais écrémé, suivi d'étapes de séchage, représentatives des productions industrielles. Une formule infantile sans traitement thermique (T-) et une formule fortement traitée thermiquement (T+++) ont été produites. Elles répondent aux exigences de qualité bactériologique requises pour ces produits et présentent des taux de dénaturation des protéines différents (4 % pour T- contre 58% pour T+++). L'objectif de ce projet est de déterminer les cinétiques de digestibilité des protéines et des acides aminés de la formule la moins dénaturée (T-) par rapport à la formule la plus dénaturée (T+++) chez le raton sevré.

Des rats Wistar mâles âgés de 21 jours en début d'expérimentation seront utilisés dans ce projet. Après 2 semaines d'adaptation au régime contenant les formules infantiles (T- et T+++), les rats recevront un repas-test (3g de régime) unique le matin à jeun. Ils seront euthanasiés à 0h, 1h, 2h, 3h et 6h après le repas (7 animaux par temps d'euthanasie). Les contenus intestinaux seront prélevés dans les différents segments du tube digestif (estomac, intestin grêle proximal, iléon terminal, caecum, côlon) et des échantillons sanguins seront collectés. L'azote et les acides aminés seront mesurés dans les contenus intestinaux, afin de déterminer leur digestibilité. Un groupe contrôle (nourris avec un régime croissance standard) consommant un repas-test sans protéines permettra de déterminer les pertes endogènes en acides aminés et azote. Ces pertes correspondent aux acides aminés et à l'azote produits par l'organisme durant la digestion et il est nécessaire de les quantifier afin de les distinguer des pertes d'azote et d'acides aminés d'origine alimentaire. De l'eau deutérée (ou eau lourde, $^2\text{H}_2\text{O}$) sera également administrée aux rats avant l'euthanasie afin de marquer les protéines endogènes avec le deutérium (^2H) (forme stable et lourde de l'hydrogène) et pouvoir distinguer pour chaque animal, les pertes en azote et acides aminés alimentaires et endogènes. Cette méthode est en cours de développement et les résultats sur les pertes endogènes obtenus avec le marquage au deutérium seront comparés aux résultats obtenus par le groupe contrôle consommant un repas-test sans protéines. La validation de la détermination des pertes endogènes par cette nouvelle méthode permettra dans le futur de s'affranchir de ce groupe contrôle et de diminuer le nombre d'animaux dans ce type d'étude.

Nous utiliserons 78 animaux au total dans ce projet avec 35 rats pour le groupe T- (5 groupes de 7 animaux T-0h, T-1h, T-2h, T-3h et T-6h), 35 rats pour le groupe T+++ (5 groupes de 7 animaux T+++0h, T+++1h, T+++2h, T+++3h et T+++6h) et 8 rats pour le groupe contrôle. L'euthanasie séquentielle des animaux est nécessaire pour déterminer la cinétique d'apparition des acides aminés et de l'azote dans le tube digestif. Le nombre de 7 rats par groupe est le minimum requis pour avoir une bonne représentation statistique. Dans le groupe contrôle, du fait d'une variabilité interindividuelle plus importante des pertes endogènes en azote et acides aminés, le nombre de rats par groupe a été augmenté à n=8.

A l'heure actuelle, il n'existe pas de méthode alternative validée *in vitro* pour déterminer la digestibilité des acides aminés car les méthodes de digestion *in vitro* ne permettent pas en l'état actuel des connaissances d'obtenir des données représentatives de la digestibilité *in vivo* des acides aminés alimentaires. Nous devons donc avoir recours aux modèles animaux et le rat est un bon modèle car son régime alimentaire et son système digestif présentent des similarités suffisamment importantes avec ceux de l'Homme pour qu'une extrapolation des résultats obtenus soit envisagée.

Il est nécessaire d'héberger les animaux en cages individuelles car nous devons suivre la prise alimentaire et donner un repas-test individuel. Les animaux resteront donc durant la totalité du protocole expérimental en cage individuelle (21 jours). Pour réduire le stress pouvant être engendré par ce type d'hébergement, les cages individuelles seront en plexiglas transparent ce qui permet

aux animaux des interactions visuelles, olfactives et auditives avec leurs congénères. Elles seront enrichies avec des tunnels.

Les protocoles expérimentaux utilisés dans ce projet ne sont pas susceptibles d'induire de douleur spécifique. Néanmoins, la manipulation quotidienne des animaux pour les mesures du poids et de la prise alimentaire permettra de suivre de manière rapprochée l'état de santé des animaux et de détecter des modifications de leur état physique ou de leur comportement.

15426 Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, elles sont à l'origine de 32% de la mortalité mondiale totale. L'Institut de veille sanitaire indique qu'en 2019, l'insuffisance cardiaque a causé 70213 décès et le nombre d'hospitalisations s'est élevé à plus de 160000 en 2019 en France.

L'insuffisance cardiaque est liée à un affaiblissement du cœur qui n'est plus capable d'assurer l'apport en sang dans l'organisme. C'est une maladie symptomatique qui se manifeste par une intolérance à l'effort, une apathie, des difficultés respiratoires (dyspnée) et des œdèmes. Cette pathologie est souvent accompagnée de facteurs de risque, tels que l'hypercholestérolémie, l'hypertension, le diabète ou l'obésité.

A ce jour, le développement de stratégies thérapeutiques efficaces pour l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée reste encore limité par le manque de modèles expérimentaux appropriés. Il s'agit de plus d'un processus intégré et complexe qui n'est à l'heure actuelle pas modélisable *in vitro*. Les mesures des paramètres physiologiques, telles que la fonction cardiaque, la pression artérielle, la fréquence cardiaque et les altérations de l'électrocardiogramme sont réalisables uniquement chez l'animal vivant.

Chez le rongeur, il existe des souches présentant ces facteurs de risque mais dont la connaissance nécessite encore d'être approfondie ou élargie dans le domaine de l'insuffisance cardiaque.

L'objectif de ce projet est d'évaluer le potentiel de différentes souches et/ou sexes de rats présentant des facteurs de risques, à devenir de nouveaux modèles animaux prédictifs pour la découverte et la sélection de candidats médicaments dans l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée.

Les facteurs de risques tels que le diabète, l'hypercholestérolémie seront caractérisés par des mesures de la glycémie, de la cholestérolémie et des tests de tolérance au glucose. Des impédancemétries permettront d'estimer la masse grasse et la masse sèche en quelques secondes.

La recherche de nouveaux modèles animaux va dans la même logique que celle de recherche de nouvelles cibles. Ainsi nous pourrons ajouter à ces expériences des recherches de biomarqueurs circulants et des quantifications d'expression de certaines protéines ou gènes en fin d'expérimentation.

Les évaluations faites sur ces animaux se voudront les plus complètes possibles pour avoir une caractérisation *in vivo* du versant cardiaque mais aussi du versant métabolique, caractérisation réalisable par des techniques non invasives permettant d'avoir un diagnostic de l'avancement de la pathologie de chaque animal rentrant dans ce projet

Pour le respect des règles des 3R nous avons prévu

Pour le raffinement : La vigilance des zootechniciens et techniciens, en concertation avec la Structure de Bien Etre Animal (SBEA) et le vétérinaire, permet de lever rapidement les alertes et prendre des décisions pertinentes pour limiter la souffrance animal (anesthésie, analgésie et soins post opératoires)

Les rats seront maintenus par deux en cages enrichies d'éléments leur permettant d'exprimer leurs instincts naturels (comme des morceaux de bois à ronger) ainsi qu'avec une litière spécifique pour rat diabétique.

Les fonctions cardiaque et vasculaire seront évaluées par des échographies et laser doppler réguliers. Ces mesures non invasives et indolores sont réalisées sous anesthésie gazeuse, le temps de la mesure afin de limiter le stress pour l'animal et peuvent être répétées au cours du temps sur un même animal, permettant ainsi de réduire le nombre d'animaux par étude. Ensuite ils sont remis dans leurs conditions d'hébergement habituelles sans incidence de stress ou de souffrance.

Pour Remplacer L'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée est un syndrome multifactoriel où les patients présentent un ou plusieurs facteurs de risque en grande partie responsables de la progression et du développement de l'insuffisance cardiaque. C'est pourquoi le recours à un animal présentant des facteurs de comorbidité est indispensable afin de permettre la compréhension des mécanismes au départ adaptatifs puis délétères, ainsi que la validation de nouveaux traitements. Il n'existe pas de méthode alternative (type *in vitro*) pour reproduire l'ensemble des conditions permettant de conduire à un remodelage des cellules cardiaques tout en ayant la possibilité mesurer la fonction cardiaque dans un système intégré et complexe. L'utilisation de l'animal est donc indispensable.

Pour réduire Le nombre d'animaux prévu par groupe sera déterminé en collaboration avec notre département de biostatistiques sur la base d'une première étude pilote.

Dans ce projet nous pensons évaluer 6 souches de rat en 5 ans (procédure 1). Pour caractériser la souche nous estimons nécessaire de réaliser 4 études comprenant à chaque fois une quinzaine d'animaux pathologiques et 10 rats sain, afin d'évaluer l'ensemble des paramètres souhaités et la variabilité de la souche soit 600 rats pour la première procédure

Pour l'étape de validation par le produit de référence (procédure 2) au moins 3 molécules seront testées par souche de rat. Pour faire une étude de ce type, il nous faudra environ (mais à recalculer avec le service biostatistique à la suite des premières études) 30 rats pathologiques et 10 rats sain contrôle donc 40 rats par étude.

40 rats x 6 souches x 3 produits de référence = 720 rats pour cette procédure 2.

Dans ce projet nous estimons nécessaire l'utilisation de 1320 rats sur une durée de 5 ans.

15427 Les maladies du foie sont un problème majeur de santé publique pour lesquelles il n'existe pas de traitement satisfaisant. Une infection par le virus de l'hépatite C (VHC) est une des principales causes de développement d'un cancer. L'activité cellulaire est finement régulée par des protéines phosphatases, tel que la Tyrosine Phosphatase de Type D (PTPRD), et tout déséquilibre dans l'activité de ces enzymes peut avoir des conséquences désastreuses pour les mécanismes cellulaires pouvant entrainer le développement d'un cancer. Toutefois, les mécanismes d'action sont en grande partie encore mal connus.

Des études préliminaires sur des biopsies de foie de patients ont montré une corrélation entre le développement de tumeur et une diminution d'expression de la phosphatase PTPRD. Cependant, ni les cibles moléculaires de PTPRD dans le foie, ni le mécanisme d'inhibition de l'expression de PTPRD sont encore connus. L'objectif de ce projet est donc d'étudier le rôle de PTPRD comme suppresseur de tumeur dans le foie.

Méthodes : le projet sera réalisé sur un modèle de souris n'exprimant pas la phosphatase PTPRD et traités par diethylnitrosamine (DEN) à 25mg/kg ou 10mg/kg induisant le développement de cancer du foie.

3 groupes de souris mâles seront analysés 36 contrôles wildtype (WT), 36 hétérozygotes (porteur de la mutation sur 1 allèle) et 36 homozygotes (porteur de la mutation sur les 2 allèles) pour la mutation décrite précédemment. Total de 108 animaux. La 1ère cohorte est constituée de 36 animaux dont 18 seront traités par du DEN et 18 autres avec le véhicule (groupe contrôle). La 2ème cohorte est composée de 72 animaux dont 36 traités au DEN et 36 traités au véhicule.

L'injection sera réalisée selon les 2 schémas suivant

Une cohorte de 36 animaux vont être traités à une concentration de 10mg/kg à l'âge de 12 jours puis des analyses échographiques seront réalisées à 4, 14, 24, 30, 36, 43 et 50 semaines d'âge.

Une cohorte de 72 les animaux sont seront traités à une concentration de 25mg/kg à 12 jours puis des analyses échographiques seront réalisées à 4, 14, 24, 30, 36, 43 et 50 semaines d'âge.

A chaque échographie est réalisée une mesure du poids des animaux (14 semaine, 24, 30,36, et 43). En parallèle de ces analyses des nécropsies avec collect du foie, seront effectuées à 50 semaines d'âge. Le planning d'analyse en annexe.

Nous tendrons vers les objectifs préconisés de réduction du nombre d'animaux utilisés, de remplacement du modèle animal et du raffinement de la méthodologie utilisée de la manière suivante :

(1) REDUCTION : Le nombre d'animaux utilisé sera minimisé autant que possible grâce au maintien en vie d'une partie de la cohorte après chaque analyse échographique. Ainsi 12 animaux par groupe seront utilisés, avec un total de 108 souris pour ce projet.

(2) RAFFINEMENT : Nous réduirons au maximum les techniques douloureuses ou stressantes en les réalisant sous anesthésie générale. Les animaux seront logés dans les meilleures conditions possibles. Chaque animal sera suivi tout au long de l'expérience afin de détecter tout indicateur de souffrance et déterminer si besoin l'arrêt de l'expérimentation et son euthanasie. Une mesure du poids sera réalisée en parallèle des échographies.

(3) REMPLACEMENT : Des analyses cellulaires et sur des biopsies humaines ont déjà été réalisées. A ce niveau d'avancement le projet vise à étudier l'effet d'une protéine mutée sur la fonction d'un organe ce qui ne peut pas être modélisé *in vitro* avec des cellules en culture.

15428 Le diabète est défini par une hyperglycémie chronique, qui apparaît lorsque le pancréas ne produit plus suffisamment d'insuline et/ou que les organes cibles n'utilisent plus correctement l'insuline. Au vu des conséquences sur la santé des patients, de plus en plus nombreux, cette maladie pose un problème de santé publique majeur. Les traitements actuels reposent sur des médicaments délivrés par voie orale et par voie sous-cutanée, dont l'efficacité dépend de leur association avec une alimentation équilibrée et une activité physique régulière. Malheureusement, tous les antidiabétiques oraux sont globalement incapables d'assurer un contrôle à long terme de la glycémie, et sont parfois suivis d'effets secondaires gastro-intestinaux. De plus, lorsque, la carence en insuline est trop importante ou lorsque l'augmentation progressive des antidiabétiques devient insuffisante en terme d'efficacité thérapeutique, l'injection d'insuline est incontournable. L'injection est une méthode contraignante et relativement invasive, pouvant provoquer une mauvaise observance des patients et un mauvais contrôle glycémique.

Dans ce contexte, le développement d'une méthode alternative de délivrance non invasive de médicaments apparaît nécessaire. Nous proposons une approche par voie transdermique.

A ce jour, des résultats obtenus *ex vivo* démontrent le passage de molécules comme l'insuline, la metformine ou l'ondansetron à travers la peau avec ce dispositif. Toutefois l'activité biologique des molécules libérées dans la peau n'a pas été démontrée et nécessite l'utilisation de modèle animal, car le diabète est une pathologie touchant de nombreux organes ou tissus cibles, mettant également en jeu de nombreuses interactions inter-organes impossibles à reconstituer *in vitro* ou *ex vivo*.

En résumé, le but de cette étude est de développer un patch capable de délivrer des médicaments antidiabétiques à travers la peau lors de stimulation (chaleur) et de tester si les substances transmises induisent leurs effets biologiques *in vivo* comparées aux méthodes conventionnelles. Pour valider l'efficacité de la méthode, nous étudierons la réponse biologique à l'insuline ou à la metformine en comparaison à son administration conventionnelle (injection ou par voie orale) chez des souris sauvages, dans des modèles de souris diabétiques et chez le mini-porc. Les études préliminaires et la réutilisation d'animaux nous permettent de limiter au maximum le nombre de souris (n=801) et de porcs (n= 12) en assurant sa validité scientifique et statistique.

Dans cette étude, le concept des 3R sera respecté

- Réduire La confirmation de résultats originaux par des pairs indépendants est systématiquement vérifiée afin d'éviter la répétition d'études antérieures, faites dans un autre pays. Le nombre d'animaux sera également limité puisque, la stimulation transdermique, l'établissement d'un profil métabolique puis si nécessaire l'isolement de la peau ou d'îlots bêta pancréatiques s'effectueront sur un même individu. Enfin, dès que possible, le groupe contrôle sera commun à plusieurs études.

- Raffiner Les protocoles pour la stimulation dermique, l'établissement du profil métabolique nécessitent un minimum de conditions induisant un stress et des douleurs. La manipulation et les soins seront promulgués quotidiennement.

- Remplacer Tout essai d'une substance sur les animaux aura été préalablement testé sur des échantillons de peaux d'animaux *in vitro*.

- Nous serons attentifs si les animaux souffrent ou présentent un comportement anormal en lien avec le responsable du bien-être animal suivant les paramètres cliniques définissant les points limites

- Perte de poids de 15% ou plus (souris, porc) (diminution de la prise de nourriture).

- Changement de comportement (prostration, apathie, agressivité, moindre mobilité, agitation (souris, porc), oreille abaissée (souris).

- Modification de l'apparence externe (dos rond, poils hirsutes (souris), signes d'infection, morsure (souris, porc).

Pour finir, le nombre de souris pour cette étude sera de 144 souris dans la procédure 1, 252 pour la procédure 2, 405 pour la procédure 3. Enfin, pour la procédure 4, les porcs utilisés seront au nombre de 12.

15429 Le syndrome dysgénésique et respiratoire porcin (SDRP) est une affection virale caractérisée par des troubles de la reproduction chez les truies et des troubles respiratoires chez les animaux en croissance. Cette maladie, très présente dans les régions à forte densité de production porcine, conduit à des pertes économiques importantes.

Parmi les mesures de lutte contre le virus du SDRP (SDRPV), la vaccination est une des plus souvent mises en œuvre sur le terrain. Les vaccins les plus utilisés sont les vaccins vivants atténués (en anglais modified live vaccine MLV). Nous avons montré que ces vaccins étaient capables de diminuer très significativement la transmission entre animaux du virus en conditions expérimentales chez des porcelets exempts d'organismes pathogènes spécifiés (EOPS) et d'anticorps d'origine maternelle (AOM) spécifiques du SDRPV. Sur le terrain, la difficulté à contrôler la transmission virale à l'aide de ces mêmes vaccins MLV suggère que certains facteurs pourraient diminuer l'efficacité théorique évaluée en conditions expérimentales. Nous avons ainsi récemment montré que les AOM pouvaient diminuer la réponse immunitaire et l'efficacité vaccinale lors d'une vaccination SDRP à l'aide d'un vaccin MLV non-macrophage tropic (ou nMT). Comme déjà montré dans d'autres espèces (volailles notamment), un vaccin MLV macrophage-tropic (ou MT), qui se réplique quant à lui dans les macrophages, pourrait être en mesure de contrecarrer cette interférence avec les AOM. Dans ce contexte, l'objectif du présent projet est d'étudier, chez le porcelet, la réponse immunitaire et l'efficacité vaccinale lors de l'administration d'un MT-MLV chez des animaux porteurs ou non d'AOM spécifiques de cette souche vaccinale.

Le projet impliquera un total de 46 animaux. Dans un premier temps des truies vaccinées (n=4) ou non (n=2) contre le SDRPV seront mises à la reproduction afin de faire naître des porcelets avec ou sans AOM spécifiques du SDRPV.

Les porcelets issus de ces truies (n= 40 porcelets) seront ensuite utilisés pour évaluer la réponse immunitaire et l'efficacité vaccinale du MT-MLV en présence ou non d'AOM spécifiques. Pour ce faire, 5 groupes de 8 porcelets chacun, issus de truies vaccinées ou non, seront eux-mêmes vaccinés ou non avec le MT-MLV. Les animaux seront éprouvés avec une souche virulente de SDRP 6 semaines après vaccination. Un groupe contrôle non vacciné, non éprouvé sera également inclus dans le dispositif.

L'infection par le virus du SDRP étant spécifique aux suidés, il n'y a pas de possibilité de remplacement du modèle porc pour cette étude. Le nombre d'animaux a été réduit au maximum tout en permettant l'obtention de données fiables et exploitables. Les porcs seront élevés en groupe, bénéficieront d'un enrichissement social et auront à leur disposition des objets manipulables. Ils seront nourris et abreuvés à volonté. En cas d'atteinte de points limites préalablement définis, les porcs seront euthanasiés afin qu'ils ne souffrent pas.

Les connaissances générées dans le cadre de ce projet permettront d'optimiser les protocoles de vaccination contre le SDRP sur le terrain et ainsi d'obtenir un contrôle plus rapide et plus efficace de cette infection en élevage par les vaccins.

15430 Les neurones sensoriels du ganglion rachidien dorsal ont pour rôle de transmettre les informations de toucher et de douleur provenant de la peau, ou de l'état de contraction des muscles. Un dérèglement du fonctionnement de ces neurones peut mener dans certains cas à des douleurs chroniques qui peuvent survenir après l'ablation d'un membre ou être un effet secondaire du diabète ou de traitements anticancéreux. Il est donc nécessaire de comprendre comment ces neurones fonctionnent pour permettre de mieux traiter ces pathologies. Des données scientifiques suggèrent qu'il est possible qu'un autre type cellulaire non-neuronal, les cellules gliales, puisse moduler les neurones sensoriels et participer à la transmission d'un signal erroné.

Le but du projet est de comprendre comment les cellules gliales peuvent moduler l'activité des neurones sensoriels dans le ganglion rachidien et de déterminer si elles sont des cibles thérapeutiques potentielles.

Afin de répondre à cette question, nous utiliserons l'expérimentation *in vivo* seule apte à reproduire le plus fidèlement possible les interactions glie-neurones dans l'environnement physiologique.

Les procédures expérimentales ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants, car l'utilisation de cultures induit des altérations morphologiques et physiologiques majeures des cellules gliales qui ne reflètent pas les mécanismes physiopathologiques existants *in vivo*. De plus, aucun modèle *in silico* n'existe pour étudier les CSG (cellules satellites gliales entourant les neurones sensoriels).

Pour cela nous utiliserons 1060 souris dont 924 issues de lignées transgéniques, sur une période de 5 ans. Des études comportementales pour mesurer la sensibilité mécanique et thermique, la posture et la locomotion, ainsi que des études de biologie moléculaire, d'immunohistochimie et d'imagerie calcique seront menées.

Dans le respect de la règle des '3R', les différentes procédures expérimentales ont été consciencieusement pensées et élaborées afin d'utiliser le moins d'animaux possible tout en permettant d'obtenir des résultats statistiquement satisfaisants.

Les procédures consistent en l'implantation chirurgicale de canule sur un ganglion rachidien dorsal, des injections et des tests comportementaux pour évaluer les capacités sensorielles thermiques et mécaniques.

Afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, les procédures se dérouleront sous anesthésie générale et des points-limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire. Ce projet permettra donc de mieux comprendre l'implication des cellules gliales dans la transmission sensorielle normale et pathologique, et pourrait mener à découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques des douleurs neuropathiques et des troubles moteurs.

15431 Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) concernent 15 millions de personnes et causent 5,7 millions de décès chaque année dans le monde. Ils restent à ce jour la première cause de handicap acquis chez l'adulte et la seconde cause de mortalité. Les AVC de type hémorragique sont causés par un saignement intracrânien. Bien que le volume de l'hématome résultant du saignement soit un facteur prédictif majeur du devenir neurologique des patients, il n'existe aucun traitement permettant d'arrêter le saignement. Le but de ce projet de recherche est de tester l'efficacité d'un nouveau traitement favorisant la coagulation dans un modèle expérimental d'AVC hémorragique. Pour cela, nous souhaitons développer un agent hémostatique basé sur une formulation de microparticules cellulaires pro-coagulantes.

Les microparticules (MPs) sont des microvésicules générées par les cellules activées et constituent des évaginations de leur membrane. Elles forment une population hétérogène de vésicules de tailles comprises entre 0,1 et 1 µm de diamètre. Ces MPs portent à leur surface des protéines (provenant de la cellule parentale) qui peuvent influencer les processus physiopathologiques. De nombreuses études ont démontré que les MPs favorisaient la formation de caillots sanguins en activant la cascade de la coagulation. Au sein du plasma, il a été mis en évidence une population de MPs pro-coagulantes qui portent à leur surface du facteur tissulaire (FT), une protéine favorisant l'activation du facteur VII de la coagulation. Notre projet vise donc à générer et utiliser de larges

quantités de ces MPs pro-coagulantes exogènes comme des pansements intravasculaires stoppant le saignement dans l'AVC hémorragique.

Cette étude basée sur l'expérimentation animale prend en compte le bien-être animal et les pratiques éthiques, et répond à la règle des 3 R (remplacer, réduire, raffiner) comme décrit ci-après. La souris est l'animal le plus étudié dans le domaine des accidents vasculaires cérébraux (AVC) hémorragiques et présente le meilleur compromis entre pertinence scientifique et sensibilité de l'espèce. La physiopathologie est donc globalement établie, ce qui nous permettra d'interpréter nos résultats de manière fiable. L'ensemble des acquis et des connaissances dont nous disposons rend cette espèce particulièrement intéressante dans le cadre de notre étude.

Nous utiliserons le nombre minimal d'animaux afin de souscrire au principe de réduction. 220 souris seront nécessaires pour réaliser les 6 étapes de ce protocole et l'utilisation d'outils d'imagerie non invasive permettant un suivi longitudinal permettra de réduire significativement le nombre d'animaux utilisés.

Afin de souscrire au principe de raffinement, les animaux seront anesthésiés durant chaque procédure. La douleur suite à la survenue de l'induction de l'hémorragie intracrânienne par modèle collagénase est considérée comme modérée les observations initiales montrent que les animaux se déplacent et s'alimentent normalement, prennent bien soin de leur pelage, n'émettent aucun son.

Le bien-être des animaux sera suivi par du personnel formé bi-quotidiennement 5j/7 et quotidiennement pendant les WE et jours fériés. Les animaux seront hébergés dans des cages standards aux normes européennes. Les principes éthiques et les standards de raffinement seront utilisés jusqu'à la mise à mort de l'animal.

15432 Les synucléinopathies sont une famille de maladies neurodégénératives comprenant la Maladie de Parkinson (MP), la démence avec présence de corps de Lewy (DCL) et l'atrophie multisystématisée (AMS). Ces maladies sont caractérisées par l'agrégation de la protéine alpha-synucléine. Les mécanismes de formation des agrégats d'alpha-synucléine et de la propagation dans le cerveau de cette protéine pathogène restent très peu connus. Les synucléinopathies ont été montrées avoir des ressemblances avec des mécanismes présents dans les maladies à prions. En effet, dans les maladies à prions, l'agent infectieux, ou prion, est capable de se propager. Une des spécificités des prions est leur capacité de résister à l'inactivation par fixation. En effet, la majorité des molécules perdent leur activité et leur potentiel infectieux lorsqu'elles sont fixées au formaldéhyde. Par contre, les prions retiennent leurs potentiels infectieux malgré cette fixation. Suite à cette découverte, l'activité pathologique d'autres protéines prions ou « prion-like » ont été étudiées. Pour la protéine A β , la protéine au cœur de la maladie d'Alzheimer, cette capacité à résister à l'inactivation par le formaldéhyde a été démontrée. Ce maintien de la capacité à former des fibrilles amyloïdes a même été maintenue après une exposition au formaldéhyde des cerveaux de patients sur le long-terme (2 ans). Pour tester la perte ou non de la capacité de transmission de l'alpha-synucléine agrégée après fixation, nous injecterons des structures cérébrales de cerveaux de patients fixés atteints de la MP et de l'AMS et contenant donc des agrégats d'alpha-synucléine. Après 4 mois d'inoculation, les cerveaux des animaux seront prélevés pour faire une analyse biochimique et histologique de l'accumulation de l'alpha-synucléine et de la progression de la maladie. Cette étude comportera 170 souris C57/Bl6J pour tester l'effet de la fixation des cerveaux sur la propagation de l'alpha-synucléine. Dans le respect du R de réduire, ce nombre de souris a été choisi pour obtenir une puissance statistique nécessaire pour évaluer l'effet de la fixation de l'alpha-synucléine sur sa propagation dans ce modèle murin. Pour le R de remplacer, nous n'avons pas assez de connaissances pour se passer de l'utilisation d'animaux vivants pour comprendre la mise en place de cette maladie. Dans le respect du R de raffinement, les expérimentateurs feront attention de limiter la douleur, la soulager si elle ne peut être évitée grâce à l'utilisation d'antalgiques, et leur fournir les meilleures conditions de vie pour la durée du projet. Les animaux vivront en groupes sociaux et auront des éléments d'enrichissement de leur milieu pour leur bien-être. La surveillance des animaux sera renforcée après la chirurgie stéréotaxique. Des points limites suffisamment

précoces seront définis pour éviter des souffrances prolongées aux animaux avec des mesures de soulagement mis en place (réhydratation, réchauffement, et traitements vétérinaires si nécessaire).

15433 Titre du projet Etude de molécules anticancéreuses, sur des tumeurs implantées en orthotopiques, chez des souris immunocompétentes

Durée du projet 5ans

Mots clés modèles de cancer, sensibilité au traitement, nouveaux traitements

Type de recherche recherche appliquée

Buts du projet Un nombre croissant d'observations réalisées chez les patients suggèrent que le système immunitaire joue un rôle important dans certains types de traitements du cancer, notamment les immunothérapies. Ce projet vise à étudier le comportement du système immunitaire, sur des modèles tumoraux implantés en orthotopiques (càd situé à son emplacement anatomique habituel) et traités aux immunothérapies. En effet, l'étude de modèle *in vivo* en orthotopique permet de mimer au mieux le mécanisme impliqué chez l'homme et d'impliquer l'organe concerné, par rapport au modèle en sous-cutané.

L'utilisation de souris immunocompétentes (au système immunitaire intact) nous permettra de déterminer le rôle du système immunitaire dans l'effet anti et pro tumoral, dans une situation qui prend en compte l'organe impliqué. Cette étude permettra donc de comprendre de façon plus fidèle, l'impact du traitement ainsi que celui du microenvironnement immunitaire, sur les cellules tumorales implantées dans leurs organes d'origines. Retombées attendues Cette étude permettra de mettre au point de nouveaux traitements impliquant le système immunitaire.

Type d'espèces et nombres d'animaux cette étude sera réalisée sur souris immunocompétentes avec un effectif total prévu de 1431 souris

Prise en compte des 3 R a) remplacement cette étude cherche à étudier l'effet du système immunitaire sur la tumeur et doit donc être réalisée sur un organisme entier nécessitant ainsi l'utilisation du modèle animal b) réduction la mise au point du modèle sera faite sur le nombre minimal de souris nécessaire et la confirmation des résultats sera réalisée sur un nombre minimal d'animaux permettant de conclure de façon fiable statistiquement; c) raffinement Afin de respecter le bien-être animal, nous ajouterons des jeux type roues en plastique en plus du quotidien de l'animalerie. Les animaux seront observés minimums 5/7 jours durant la durée de l'expérience afin de pouvoir réduire, supprimer ou soulager leur douleur ou leur détresse et ainsi améliorer leur bien-être; toutes les précautions nécessaires seront prises pour détecter et minimiser la souffrance des animaux dans ce cadre, un antalgique ou analgésique sera également utilisé dans les procédures de chirurgie afin d'enrayer la douleur chez l'animal.

15434 Le poumon est un organe vital dont les pathologies, au stade terminal, peuvent induire une diminution de l'oxygénation du patient mais aussi une insuffisance respiratoire avec, à terme, une défaillance cardiaque droite. Actuellement, la transplantation pulmonaire demeure donc la seule solution pour les patients en insuffisance respiratoire terminale, et ce malgré les progrès thérapeutiques. Néanmoins, cette solution n'est pas accessible à tous puisque seulement une population sélectionnée est éligible. De plus, le manque de greffon, la durée d'attente et les résultats à long terme avec le risque de rejet chronique n'en font pas une solution idéale. D'ici 2025, du fait du vieillissement de la population, les maladies respiratoires deviendront la troisième cause de mortalité, dans les pays industrialisés.

Les maladies respiratoires peuvent se traduire par un défaut d'oxygénation due à une destruction des alvéoles ainsi qu'une défaillance cardiaque droite lorsque la maladie est très avancée. Or les solutions thérapeutiques actuelles ne permettent pas de remplacer les poumons de manière durable. C'est pourquoi, dans le cadre de notre projet qui vise à mettre au point une solution durable de remplacement des poumons en cas de maladie réfractaire à toutes les thérapies disponibles, nous avons développé une nouvelle génération d'oxygénateur micro-fluidique. Ces nouveaux oxygénateurs micro-fluidique permettent d'obtenir avec 1 seul oxygénateur des résultats très

intéressants. En connectant 5 de ces oxygénateurs en parallèle nous pourrions obtenir de meilleurs résultats que les études récentes dans ce domaine.

L'objectif de notre projet est donc de tester l'efficacité de ce nouvel oxygénateur microfluidique avant de pouvoir passer aux tests cliniques chez l'homme.

Notre protocole prévoit d'utiliser un modèle expérimental porcin. Il fait suite à différents tests réalisés sur des petites quantités de sang de porc (quantité de sang n'altérant pas le bien-être de l'animal) prélevé sur des animaux présents sur le site, à la fin des expériences sur les porcs pour d'autres études, cela afin de rentabiliser l'utilisation des animaux. Ces tests ont permis de tester différents oxygénateurs et d'éliminer ceux ne permettant pas d'atteindre les valeurs d'oxygénation requise pour passer chez le gros animal puis l'homme. Cependant, il n'existe actuellement pas de méthodes alternatives (bancs d'essai, cultures cellulaires, simulation numérique...) permettant de modéliser l'effet de l'oxygénateur micro-fluidique sur les gaz du sang du sang ainsi que l'effet du débit sanguin sur l'oxygénateur. Il est donc nécessaire de tester les oxygénateur micro-fluidique sélectionnées, chez le porc, avant de pouvoir passer à la phase clinique chez l'homme. Pendant la procédure de multiples paramètres physiques et biologiques sont mesurés directement sur l'animal afin de démontrer l'efficacité de l'oxygénateur. Le nombre maximal d'animaux nécessaires pour cette étude a été fixé à 8. De plus, afin de réduire le nombre d'animaux utilisé, nous testerons deux types différents d'oxygénateurs sur le même animal. La mise en place de l'oxygénateur ainsi que les différents tests sont réalisés sous anesthésie générale. A la fin de l'expérience, l'animal sera euthanasié. A aucun moment l'animal n'est conscient ni susceptible de ressentir la douleur durant la procédure. Pour améliorer le confort et le bien-être des animaux, les animaux sont hébergés dans l'animalerie une semaine avant l'intervention afin de respecter une période d'acclimatation. Ils sont gardés parmi leurs congénères pour réduire leur stress, à raison de deux par enclos. Du personnel animalier professionnel s'occupe d'eux quotidiennement et met à disposition un environnement stimulant (activité de fouissage, distributeur d'aliments, planche à gratter...).

15435 L'autoimmune PolyEndocrinopathy - candidiasis - Candidiasis - Ectodermal - Dystrophy est une maladie auto immune héréditaire rare qui reste aujourd'hui mortelle et incurable. Les patients atteints de cette pathologie présentent une déficience pour la protéine autoimmune regulator qui est le régulateur de la transcription clé de la sélection négative. Lorsque AIRE n'est pas exprimée les thymocytes auto-réactifs échappent à la délétion clonale ce qui conduit au développement d'auto-immunité en périphérie.

Récemment notre équipe a généré le premier modèle de rat déficient pour la protéine AIRE. Contrairement aux modèles déjà existants, celui-ci présente des symptômes similaires à la pathologie humaine. Par ailleurs, l'équipe a également démontré le potentiel de l'immunothérapie anti-CD45RC dans l'induction de la tolérance, dans un modèle d'allogreffe cardiaque incompatible et dans un modèle de GVHD chez le rat.

Ainsi nous avons émis l'hypothèse que l'immunothérapie anti-CD45RC permettrait de contrôler le développement des symptômes auto-immuns de l'APECED.

L'objet de cette saisine est d'évaluer le potentiel thérapeutique d'un anticorps anti-CD45RC sur les symptômes auto-immuns présentés par le modèle de rat Aire-/- du syndrome APECED.

Dans cette saisine, la règle des 3R a été suivie comme suit

- Remplacer Des études fonctionnelles ont été réalisées *in vitro*, les résultats sont prometteurs mais sont limités par l'absence du contexte physiologique et de la complexité du système immunitaire et ne peuvent remplacer les études *in vivo*.

- Réduire Le nombre d'animaux par groupe est réduit au nombre nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement significatifs (Log Rank test pour les courbes de survie, description des tests statistiques utilisés détaillée ci-après). Le nombre de groupes a été réfléchi de sorte à avoir les contrôles suffisants pour pouvoir conclure quant aux résultats obtenus. Le nombre total maximum d'animaux escomptés pour le test de thérapie dans le modèles de rat Aire-/- 120.

- Raffiner Les animaux atteignant une perte de poids de 20% par rapport à leur poids initial seront euthanasiés, ainsi que les animaux montrant des signes physiques caractéristiques d'un mal être

tel qu'un changement de comportement. Durant le protocole, les animaux seront suivis pour leur poids, le développement des symptômes de l'APECED (vitiligo, alopecie et dystrophie onguulaire). Des prélèvements sanguins seront effectués à Jour 10 pour valider la déplétion des cellules par l'anticorps. Tous les animaux traités avec la molécule et ceux des groupes contrôles seront analysés afin d'en obtenir un maximum d'information post mortem, au niveau anatomopathologique pour les lésions dans les organes dues à l'auto-immunité et par immunohistologie pour étudier l'infiltration des cellules dans les tissus inflammés.

Dans l'ensemble de ce projet 280 rats seront utilisés, toutes souches et génotypes confondus. Grâce à ce "n", les résultats obtenus dans chaque procédure pourront être statistiquement significatifs ce qui permettra ainsi d'établir une preuve de concept quant à l'utilisation d'un anticorps ciblant la molécule CD45RC dans les maladies auto-immunes. De ce fait, nous déterminerons le potentiel thérapeutique de l'anticorps anti-CD45RC sur les réponses immunes intervenant lors d'une rupture de la tolérance centrale, la durée de traitement nécessaire et suffisante à envisager pour un traitement chez l'Homme, et les mécanismes d'action de l'anticorps sur les cellules. L'anticorps anti-CD45RC utilisé dans cette étude fait l'objet d'un brevet quant à son potentiel thérapeutique prometteur pour le traitement des maladies autoimmunes et dans le domaine de la transplantation d'organe solide et de cellules.

15436 L'obésité abdominale s'accompagne d'un état inflammatoire chronique à bas bruit, qui participe à la pathogénie de la résistance à l'insuline et du diabète de type 2 (T2DM). Ainsi, le syndrome métabolique et le développement d'un T2DM sont associés à une production anormale de cytokines pro-inflammatoires parmi lesquelles le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF α), acteur de l'inflammation et de la défense immunitaire.

Le TNF α a été le premier des marqueurs de l'inflammation dont l'implication dans la pathogénie de la résistance à l'insuline a été mise en évidence. Le TNF α est surexprimé dans le tissu adipeux et le muscle strié squelettique (SkM) des sujets obèses présentant une résistance à l'insuline. La production cellulaire de TNF α et son taux plasmatique sont par ailleurs accrus dans l'obésité et le T2DM. Le TNF α détériore l'action de l'insuline dans les tissus sensibles tels que le foie, le SkM et le tissu adipeux.

Dans notre laboratoire, des travaux ont démontré *in vitro* qu'un traitement de cellules musculaires humaines par du TNF α stimulait la sécrétion de myokines qui régulent la production d'insuline par les cellules β -pancréatiques, positionnant le SkM comme un régulateur de la sécrétion d'insuline par le pancréas. Récemment, il a été démontré qu'en plus de myokines, le SkM sécrète des vésicules extracellulaires (EVs) qui participent à la myogenèse et à l'effet délétère des régimes high-fat en agissant de façon paracrine sur le muscle et endocrine sur le pancréas.

Dans ce contexte, nous souhaitons déterminer l'effet du TNF α i) sur la production et la composition des EVs par la cellule musculaire, et ii) sur l'activité biologique des EVs musculaires à travers une évaluation de son impact sur la sécrétion d'insuline par les cellules β , et sur la fonction musculaire (résistance à l'insuline, prolifération des myoblastes, différenciation en myotubes). De façon préliminaire, nos données générées *in vitro* indiquent notamment que i) le TNF α affecte le métabolisme lipidique des cellules C2C12 mais également la relargage et la composition des EVs produites par ces cellules, et ii) les EVs produites après traitement TNF α diminuent la réponse à l'insuline des cellules C2C12 receveuses suggérant qu'elles pourraient induire un signal paracrine délétère au niveau du muscle et diffuser l'action du TNF α .

L'objectif du projet est de déterminer *in vivo* dans quelle mesure l'injection intramusculaire de EVs libérées par des myotubes soumis à un traitement TNF α pourrait moduler négativement le processus de régénération d'un muscle lésé de souris.

Un maximum de 85 souris sera inclus dans ce projet, qui comprendra 5 groupes de 15 animaux maximum, recevant soit du PBS (groupe contrôle) soit individuellement un des deux types d'EVs étudiés (microparticules ou exosomes) et qui seront obtenus auprès de myotubes préalablement soumis ou non à une stimulation TNF α . Deux souris par groupe pourraient être ajoutées en cas d'exclusion de certains animaux pour des raisons éthiques.

La totalité des souris sera sacrifiée 3 semaines après injection des EVs pour renseigner leur impact sur la séquence de régénération musculaire, le métabolisme lipidique et la voie du cholestérol par analyse histopathologique, immuno-histochimique et de biologie moléculaire. Des prélèvements sanguins seront en outre réalisés à l'initiation, pendant et à l'issue du protocole pour déterminer la glycémie, l'insulinémie et la lipidémie.

L'application de la règle des 3R au cours de ce projet sera effectuée comme suit

- Réduction : Le nombre d'animaux inclus sera de maximum 15 souris par groupe. Ce nombre est basé sur notre expérience précédente de protocoles de thérapie cellulaire lors desquels nous avons pu obtenir des résultats cohérents et reproductibles dans des groupes de cette taille. Cela semble être un nombre minimal qui permette d'assurer la robustesse des résultats sans qu'il soit excessif en termes d'animaux à inclure. Une étude statistique est prévue pour comparer les groupes (test non paramétrique type Kruskal-Wallis à un facteur suivi de comparaisons multiples par paires).

- Raffinement : 1) de bonnes conditions d'hébergement selon la réglementation en vigueur avec enrichissement du milieu (tunnels en cartons, frisottis de papier (sizzle dry), bûchettes de bois et hébergement à deux animaux si possible).

2) un suivi régulier des animaux (observations biquotidiennes, pesées régulières, analyse du comportement),

3) l'instauration de points limites pertinents avec mise en place de mesures adaptées (anesthésies, analgésie ou euthanasie si pas d'autre alternative),

4) une réactivité accrue du personnel animalier avec mise en place d'une grille de scoring de la douleur dès que nécessaire pour détecter précocement tout point limite et mettre en place les actions adéquates (Cf. annexe I)

- la mise en place de mesures adaptées en fonction des interventions (anesthésie et analgésie si nécessaire).

- Remplacement le remplacement d'animaux ne sera pas possible dans cette étude car l'objet est ici précisément de tester l'effet des EVs *in vivo* après avoir générées des données expérimentales *in vitro*, et ce, dans le but de déterminer leur pertinence biologique. L'animal est le seul organisme vivant permettant d'étudier cet impact sur le phénotype d'un muscle lésé.

15437 Comprendre comment le cerveau encode, consolide, stocke et restitue nos souvenirs est fondamental en Neurosciences. Ces fonctions reposent sur des circuits neuronaux précis et complexes reliant de grands ensembles de neurones. Les protéines de la Polarité Cellulaire et Planaire (PCP) sont exprimées dans le cerveau des mammifères et s'accumulent dans la région de l'hippocampe, une structure très importante pour l'apprentissage et la mémoire.

Dans ce projet, nous souhaitons comprendre comment ces protéines participent chez l'individu adulte aux processus d'apprentissage et de mémorisation. Pour cela, nous utiliserons des outils viraux qui permettent d'invalider ou d'exprimer une protéine directement et spécifiquement dans l'hippocampe des souris. La principale partie de ce projet sera consacrée à tester et évaluer la capacité des souris à effectuer des tâches de mémoire.

Règle des 3R. Remplacer Ce projet s'intègre dans un projet plus global combinant différents travaux de recherche complémentaires allant de l'étude biochimique ou bio moléculaire au comportement. Beaucoup d'études « in-vitro » sont donc effectuées sur des cellules en culture en amont de l'utilisation de lignées d'animaux pour limiter au maximum leur utilisation. Réduire Afin d'utiliser le nombre minimal d'animaux mais de garantir la validité scientifique et statistique des résultats, nous avons évalué par une étude empirique qu'un nombre minimum de 15 animaux par groupe est nécessaire pour notre étude. Raffiner Pour supprimer l'angoisse, la détresse ou la douleur subie par les animaux au cours de l'expérience, les animaux sont élevés en cage enrichie avec un nid végétal, surveillés régulièrement et des points limites suffisamment précoces ont été mis en place. De plus concernant la procédure de chirurgie, une analgésie préalable, le mode d'anesthésie (gazeuse + locale) ainsi que le suivi-post opératoire permettent de réduire au minimum l'inconfort

et la douleur de l'animal. Pour ce projet nous avons estimé le nombre total d'animaux nécessaire à 240 souris sur 5 ans.

15438 Le diagnostic de maladies infectieuses repose sur différents critères signes cliniques, radiologiques, facteurs de risque associés... et sur les résultats de tests biologiques. L'utilité des tests biologiques est d'autant plus grande que certaines infections présentent peu ou pas de signes cliniques caractéristiques. Un large panel de tests biologiques existe de la mise en culture de prélèvements à la recherche d'anticorps spécifiques dans le sang des patients. La recherche d'antigènes circulants spécifiques fait également partie de ce panel de tests.

Un prototype de test de diagnostic rapide a été développé pour les méningocoques et ce test doit être assemblé en ajoutant une ligne test dont le prototype est validé.

C'est dans le but de développer et commercialiser des tests diagnostiques de maladies pour l'Homme, que notre laboratoire travaille en collaboration avec une start-up industrielle. Nous souhaitons mettre au point un test fiable, spécifique et sensible de recherche d'antigènes capsulaires de ce pathogène. L'utilisation d'anticorps spécifiques de ces antigènes est la clé de voute de la mise au point de ce test rapide de recherche d'antigènes. L'obtention de tels anticorps passe par l'immunisation d'animaux avec des souches bactériennes inactivées. Ce système va déclencher des mécanismes identiques à ceux engendrés par une vaccination suite à l'injection de ces bactéries inactivées, le système immunitaire de l'animal va produire des anticorps afin d'éliminer les antigènes, étrangers par définition. Ces anticorps, après purification, permettront de détecter les antigènes présents dans le liquide céphalorachidien des patients infectés.

Nos différentes expérimentations suivront le même schéma expérimental. Des lapins, 3 par lot d'antigène, seront immunisés par des bactéries neutralisées avec des rappels effectués sur 6 semaines (J0, J7, J21, J28, J35), impliquant au maximum 27 lapins, sur une période de 5 ans. Lorsque le taux d'anticorps, contrôlé par prélèvement sanguin, aura atteint son maximum, les lapins seront sacrifiés afin d'obtenir un volume de sang maximal permettant ainsi de limiter au minimum le nombre d'animaux utilisés. Par ailleurs, tout lapin ne répondant pas à l'immunisation pourra être réhabilité ou remplacé sur avis du vétérinaire (car procédure expérimentale de classe légère). Toute manipulation sera réalisée afin d'éviter au maximum le stress et la douleur des animaux. Si, malgré ces précautions, l'animal présente une réaction immunologique inattendue (effets secondaires, douleurs inattendues définies comme limites), l'animal sera mis à mort afin de lui éviter toute souffrance inutile. Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité, par du personnel qualifié, pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. La douleur (si elle est présente) est rigoureusement contrôlée grâce à des points limites évalués en amont, et gérés grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (myorelaxant / anesthésie/analgésie). Par ailleurs, les animaux sont hébergés dans un environnement enrichi (cage spécifique et normée, bâtonnets à ronger). Enfin, l'eau et la nourriture sont mises à disposition "ad libitum" et de la musique est diffusée en salle d'hébergement pour diminuer le stress et atténuer les bruits environnementaux.

Notre objectif, dans un premier temps, est de répondre à une forte demande de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et des médecins spécialistes d'avoir des tests fiables permettant la détection des sérogroupes des méningocoques à fort potentiel épidémique.

Avec ce même objectif, des procédures similaires appliquées à d'autres infections bactériennes potentiellement graves, pourront être engagées en fonction des besoins des tests diagnostiques en infectiologie.

15439 Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) touchent 250 000 personnes en France et sont dues à une trop forte activité du système immunitaire du tube digestif. Les lymphocytes T reconnaissant les bactéries intestinales sont impliqués dans les causes des MICI, mais leurs rôles avant et pendant la maladie restent mal compris. L'objectif de ce projet de recherche fondamentale est de caractériser une population de lymphocytes T, retrouvée chez l'homme et la souris et reconnaissant les bactéries du microbiote, dans un nouveau modèle murin de MICI.

Nous utiliserons des souris qui, à cause de facteurs génétiques, développent spontanément une MICI à l'âge de 20 semaines. Nos données préliminaires indiquent que la population de lymphocytes T d'intérêt est très fortement activée dans ce nouveau modèle, comme chez l'humain atteint de MICI. Ce système expérimental représente donc un excellent modèle pour l'étude des stades précoces des MICI. Le projet d'étude de ces lymphocytes et de la flore intestinale permettra de mieux comprendre le rôle des lymphocytes T dans les MICI.

Nombre de souris pour ce projet 18. Ce projet se conforme à la règle des 3 R qui régit l'expérimentation animale

Remplacer des données de la littérature indiquent que les lymphocytes T que nous étudions sont impliqués dans les MICI chez l'humain. Cependant, du fait du tissu ciblé (l'intestin), l'étiologie des MICI implique l'environnement, le microbiote, la génétique de l'hôte, et son système immunitaire. La complexité de cette maladie la rend très difficile à modéliser *in vitro* ou *in silico* (= par ordinateur). Seuls les modèles murins permettent de récapituler la maladie dans sa complexité et d'élucider le rôle qu'y jouent les lymphocytes T.

Réduire les résultats attendus à l'issue de ce projet n'ont pas été publiés à ce jour dans la littérature scientifique. Le nombre de souris à utiliser (18) a été calculé pour obéir aux minima nécessaires à des analyses statistiques valides, condition nécessaire pour une interprétation biologique des résultats.

Raffiner Les animaux seront suivis quotidiennement afin d'assurer leur bien-être et pour monitorer les éventuels signes de douleur, de souffrance ou de stress. Des points-limites ont été établis.

15440 La demande d'amendement de ce projet concerne l'utilisation de la télémétrie pour 60 rats supplémentaires et pour le modèle souris, faisant l'hypothèse d'une influence des hormones sexuelles sur la mortalité, nous souhaitons réaliser des orchidectomies et ovariectomies pour 100 souris supplémentaires. Nous implanterons également chez ces animaux castrés des pompes à angiotensine II pour tester l'hypothèse que les événements de rupture artérielle observés soient liés à un stress lors de la puberté.

Le projet porte sur une maladie génétique rare sévère du tissu conjonctif (fréquence de 1/150 000) le syndrome d'Ehlers Danlos vasculaire (SEDv), avec un mauvais pronostic puisque la moitié des patients décède avant l'âge de 50 ans. La majorité des décès est due à des ruptures artérielles imprévisibles, l'autre complication majeure étant des perforations digestives. Chez les patients on a pu identifier des mutations du collagène de la matrice extracellulaire de différents tissus tels que les artères, le colon ou l'utérus. Une précédente étude a montré l'efficacité d'un β bloquant vasodilatateur, sur l'incidence des complications. Seule l'expérimentation animale sur des animaux reproduisant ces mutations permettra d'étudier les mécanismes impliqués dans la survenue des ruptures artérielles. Le but étant de proposer des thérapies ciblées limitant la survenue des complications chez l'homme. Un modèle transgénique existe déjà chez la souris, mais la difficulté technique liée au manque de tissu disponible (aortes de souris) nous conduit à nous orienter vers la création de modèles rats. En premier lieu, des essais précliniques seront conduits sur le modèle transgénique murin déjà produit. Les animaux recevront les médicaments dans l'eau de boisson et leur suivi clinique sera effectué par mesure non invasive de la pression artérielle (brassard à la queue) une fois par mois durant 24 semaines. En parallèle, deux modèles similaires seront créés chez le rat par une technique de transgénèse innovante et validée qui évite la création de lignées et les nombreux croisements permettant leur maintien, afin de réduire le nombre d'animaux utilisés aux seuls animaux nécessaires à l'expérimentation. Afin de confirmer une différence de pression artérielle ou de fréquence cardiaque mesurée à la queue nous souhaitons développer l'utilisation de la télémétrie chez le rat. A la fin du protocole les animaux seront euthanasiés pour prélever des tissus destinés à caractériser les mécanismes physiologiques et moléculaires de survenue de ruptures artérielles avec ou sans traitements. Le projet est prévu sur 5 ans. Au total 1610 animaux pourraient être utilisés 1100 souris et 400 rats sont prévus pour les essais thérapeutiques et nous prévoyons 50 rats pour la création du modèle transgénique. Pour respecter le principe des 3R, le nombre des animaux sera réduit au minimum par exemple en ne soumettant pas les rats à un essai infructueux chez la souris. Pour éviter toute souffrance, la chirurgie de réimplantation d'embryons

lors de la création des modèles transgéniques, se fera sous anesthésie générale avec antalgie post-opératoire. Pour diminuer le stress, les animaux suivront une période d'habituation pour les mesures de pression et la mise sous traitement per os avec contrôle du maintien du poids et de la croissance. Enfin, des points limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée éventuelle de l'animal. A terme, les résultats de ce projet permettraient de mieux comprendre les mécanismes moléculaires conduisant à ces ruptures artérielles et de proposer des thérapies ciblant les voies moléculaires identifiées pour améliorer le diagnostic, le confort de vie des patients et le traitement.

15441 Bien que la pathogenèse exacte de la migraine ne soit pas encore connue, des nombreuses études cliniques suggèrent que le cortex cérébral des migraineux est hyper excitable car les malades sont hypersensibles à la lumière et aux sons. Ainsi, lors d'une attaque de migraine on observe des perturbations telles que l'aura visuelle (scintillements) qui précède la céphalée migraineuse. La dépression corticale propagée (CSD) observée chez le rongeur est considérée à la fois comme le substrat physiopathologique de l'aura visuelle et aussi comme un déclencheur de la céphalée qui s'ensuit.

Des nombreuses études suggèrent l'existence d'un lien neurovasculaire fort entre migraine et CSD. Cependant, les mécanismes d'initiation et de propagation de la CSD et le lien avec la céphalée qui en résulte ne sont que partiellement connus. De plus, il n'existe aucun modèle qui récapitule l'impact de la CSD sur l'activation des régions cérébrales impliquées dans la genèse des céphalées migraineuses.

Notre projet propose d'identifier chez le rat les mécanismes dysfonctionnels cérébraux déclenchés à la suite d'une CSD par des enregistrements électrophysiologiques *in vivo* couplés à l'imagerie cérébrale fonctionnelle ultrasonore à haute résolution spatio-temporelle (fUS). Les rats seront anesthésiés, ventilés, équipés d'une fenêtre intracrânienne permettant d'avoir accès au cortex somatosensoriel ainsi qu'aux structures cérébrales relayant les informations sensorielles au cortex grâce à l'imagerie fUS. La CSD est induite par l'application de Chlorure de Potassium 1M sur la dure-mère. Nous évaluerons l'évolution des réponses électrophysiologiques et hémodynamiques (et leur couplage) à des stimulations électriques appliquées sur la face avant et après l'induction d'une CSD et les effets de différents traitements pharmacologiques permettant de mettre en évidence les mécanismes de plasticité induite par la CSD.

Les procédures de chirurgie se feront uniquement sous anesthésie générale gazeuse profonde compatible avec les enregistrements électrophysiologiques et hémodynamiques, durant toute la durée de l'expérience. Le niveau d'anesthésie, l'absence de douleur et de stress, les paramètres physiologiques principaux sont contrôlés à tout moment durant l'expérience. Ce projet portant sur l'étude de la plasticité d'un système intégré et mature, il nous est impossible de remplacer l'utilisation d'animaux par des tests *in-vitro*.

Ce projet se déroulera sur une période de 3 ans et nécessitera au total l'utilisation de 120 rats. En accord avec la règle des 3R, le nombre d'animaux utilisés est réduit au minimum nécessaire pour réaliser les tests statistiques. Des analyses intermédiaires réalisées avant la fin du projet permettront de raffiner ce nombre et de le réduire en cas d'effet significatif.

Les résultats issus de ce projet permettront d'identifier des possibles biomarqueurs de plasticité pathologique cérébrale à l'origine des céphalées migraineuses chez le rat, ainsi que leur ciblage par des stratégies pharmacologiques sélectives. Ce nouveau modèle translationnel constituerait un outil performant pour des essais d'analgésie visant notamment la prévention des céphalées primaires.

15442 La colite ulcéreuse ou rectocolite hémorragique (RCH) fait partie des deux principales maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) avec la maladie de Crohn, et affecte l'extrémité distale du tube digestif, côlon et rectum. La colite ulcéreuse se classe parmi les maladies inflammatoires parce qu'elle occasionne une inflammation, des plaies, des saignements et une déstructuration sur les parois internes du côlon appelée fibrose. L'inflammation débute habituellement près du rectum

et gagne ensuite l'intérieur du côlon. L'inflammation se manifeste sur des régions adjacentes plutôt que sur de petits segments.

La colite ulcéreuse est une maladie auto-immune, c'est-à-dire qu'elle est causée par un dérèglement du système immunitaire qui s'attaque à ses propres cellules. Les causes de la colite ulcéreuse sont toutefois mal connues. Les scientifiques pensent que l'inflammation de la muqueuse colorectale est causée par une réaction immunitaire excessive de l'organisme contre des virus ou des bactéries présentes dans l'intestin. Selon l'hypothèse la plus probable, cette réaction auto-immune serait dirigée contre les bactéries « inoffensives » normalement présentes dans le tube digestif (la flore intestinale).

L'inflammation s'accompagne de la formation d'ulcères pouvant saigner et produire du mucus ou du pus. Les personnes atteintes de colite ulcéreuse doivent être attentives au risque d'anémie car lorsque la maladie est grave, les pertes de sang peuvent être abondantes, pertes que l'on peut compenser grâce à des suppléments en fer. Des facteurs génétiques et environnementaux influenceraient l'apparition de cette maladie. Le stress et les intolérances alimentaires peuvent déclencher les symptômes chez certaines personnes, mais ces facteurs ne seraient pas à l'origine de la maladie.

La colite ulcéreuse est une affection imprévisible, caractérisée par des rechutes ou poussées suivies de rémissions. Il est impossible de prévoir la survenue d'une poussée au cours de laquelle les personnes atteintes peuvent avoir une diarrhée sanglante, des crampes d'estomac et une perte de poids. Il se peut également qu'elles soient dans l'incapacité d'accomplir des tâches habituelles, voire même qu'elles aient besoin de se faire hospitaliser. La colite ulcéreuse peut également augmenter le risque de cancer colorectal. Les personnes atteintes de colite ulcéreuse doivent faire effectuer régulièrement une coloscopie de dépistage.

Enfin, plusieurs complications liées à l'usage à long terme de certains médicaments, comme les corticostéroïdes ou les immunosuppresseurs, peuvent survenir. Ainsi, l'usage des corticostéroïdes sur de longues périodes rend plus à risque la survenue d'ostéoporose, de cataracte, d'hypertension, de diabète de type 2. Les corticoïdes et les immunosuppresseurs peuvent aussi augmenter le risque d'infection.

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'efficacité d'un composé X ayant des propriétés anti-inflammatoires et antalgiques à celle de traitements médicamenteux de classes différentes ayant des effets significatifs connus sur la colite ulcéreuse mais avec également des effets secondaires, sur une ulcération colique induite chez le rat, ce qui ne peut être réalisé sur des modèles *in vitro* ou *in silico* (remplacement). 56 rats mâles Wistar sont utilisés pour ce projet, répartis en groupes de 8 animaux. Ils sont placés à 2 par cage, avec une feuille de papier absorbant comme enrichissement du milieu. Les traitements avec ces composés non génotoxiques pour les cellules, non toxiques pour les animaux aux doses testées, et non allergisants sont effectués par administration orale.

L'induction d'ulcération colique est effectuée sous anesthésie par instillation rectale d'un agent chimique après mise à jeun préalable des animaux pendant 24 heures (Procédure 1). Les traitements par voie orale avec le composé X à tester à 3 doses, les 2 traitements de référence à une seule dose, Prednisolone (corticoïde) et Pentasa (anti-inflammatoire intestinal), débutent 24 heures après induction de la colite ulcéreuse et sont effectués pendant 6 jours après induction de la pathologie. Un groupe d'animaux induit et un groupe d'animaux non induits sont traités dans les mêmes conditions avec un placebo (Procédure 2). Au cours des 8 jours d'expérimentation entre la mise à jeun des animaux et leur mise à mort, un suivi quotidien de leur poids corporel et de leurs consommations alimentaire et hydrique est effectué, de même qu'une observation spécifique du comportement des animaux dans leur cage pour évaluer le niveau de douleur ressentie au travers de l'observation de leur posture, de l'état de leur fourrure et de l'ouverture de leurs yeux. L'évaluation de la douleur ressentie se fait également par la réalisation d'un test comportemental dit de l'Open-Field, 24 heures après le dernier traitement oral et juste avant leur mise à mort, pour évaluer l'activité exploratoire des animaux distance parcourue, nombre de cases traversées, nombre de redressements sur les pattes arrière et durée d'immobilité (Procédure 3). Les animaux sont mis à mort après réalisation de ce test comportemental. Ils sont placés sous anesthésie gazeuse pour effectuer un prélèvement de sang par ponction cardiaque pour la mesure de

biomarqueurs sanguins, puis une injection d'une surdose d'euthanasique est effectuée également en intracardiaque (Procédure 4). Le colon est alors prélevé, fixé ou congelé pour effectuer des analyses en histologie classique et en microscopie de fluorescence après réalisation de coupes à froid (cryostat), ainsi que des analyses de biologie moléculaire pour étudier l'expression de biomarqueurs de l'inflammation.

Afin de limiter le nombre d'animaux utilisés (réduction) mais de permettre une approche statistique des résultats obtenus, les 7 groupes de traitement sont constitués de 8 rats chacun. Des feuilles de papier absorbant seront utilisées comme enrichissement et placées dans chaque cage pour le bien-être des animaux (raffinement). Les points limites suivis seront l'évolution pondérale des animaux, leur état physiologique (activité, posture, état de la fourrure, ouverture des yeux, tremblements...) et leurs consommations alimentaire et hydrique. En cas d'atteinte d'un point limite, les animaux seront mis à mort par une méthode en conformité avec les recommandations éthiques (injection d'une surdose d'euthanasique sous anesthésie préalable).

15443 Les lymphocytes sont des cellules immunitaires qui jouent des rôles centraux dans les défenses contre les agents pathogènes, mais aussi dans les interactions avec les bactéries non-pathogènes colonisant les muqueuses et la surface du corps. Ces bactéries non-pathogènes sont présentes en très grand nombre dans l'intestin (environ 10¹⁴ bactéries, soit autant que de cellules humaines dans le corps entier) et assurent des fonctions essentielles telles que la digestion et la protection contre les agents pathogènes. L'ensemble des microbes colonisant l'intestin est appelé le microbiote intestinal. On parle de symbiose entre l'hôte humain et son microbiote intestinal, car les 2 partenaires de l'interaction en tirent un bénéfice.

L'inflammation intestinale entraîne un changement de l'éco-système de l'intestin, ce qui modifie la composition du microbiote intestinal. On parle alors de dysbiose (par opposition à symbiose). Déchiffrer les interactions entre les lymphocytes et les bactéries du microbiote est essentiel pour comprendre les nombreuses pathologies associées à une dysbiose intestinale, notamment les maladies inflammatoires de l'intestin (maladie de Crohn, rectocolite hémorragique), le diabète de type 1 et l'obésité. Les fonctions des lymphocytes reposent sur leur capacité à reconnaître des molécules bactériennes ou virales appelées antigènes. L'un de ces antigènes est produit par environ 80% des bactéries, y compris par certaines bactéries du microbiote intestinal. Les lymphocytes reconnaissant cet antigène microbien sont activés chez les patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, de diabète de type 1 et d'obésité. Dans ce projet, nous cherchons à déterminer quelles bactéries de l'intestin fabriquent l'antigène, et quelles sont les conséquences de l'inflammation intestinale sur cette fabrication.

Pour cela nous utiliserons trois modèles murins de dysbioses intestinales un modèle d'induction chimique d'inflammation de l'intestin, un modèle de diabète de type 1 et un modèle d'obésité.

L'étude permettra de comprendre pourquoi certains lymphocytes sont activés dans les pathologies associées à l'inflammation intestinale, ce qui permettra d'envisager de nouvelles approches thérapeutiques visant à moduler cette activité immunitaire. Le projet renseignera aussi sur un nouveau mode d'interaction entre le microbiote intestinal et le système immunitaire.

Nombre d'animaux pour ce projet : 216 souris.

Remplacer dans une étude préliminaire, nous avons analysé *in silico* (par ordinateur) le microbiote de souris présentant une inflammation intestinale. L'analyse prédit que le microbiote de l'intestin enflammé produira plus d'antigènes pouvant activer les lymphocytes d'intérêt. L'étude de bactéries *in vitro* renforce notre hypothèse. Nous souhaitons maintenant valider ces résultats *in vivo*. Il n'existe pas de méthode alternative pour réaliser ce travail qui nécessite l'analyse d'échantillons intestinaux frais.

Réduire les résultats attendus à l'issue de ce projet n'ont pas été publiés à ce jour dans la littérature scientifique. Le nombre de souris à utiliser (216) a été calculé pour obéir aux minima nécessaires à des analyses statistiques valides, condition nécessaire pour une interprétation biologique des résultats.

Raffiner Les animaux seront suivis quotidiennement afin d'assurer leur bien-être et pour monitorer les éventuels signes de souffrance ou de stress. Des points-limites ont été établis.


15444 De nombreuses études présentent une corrélation entre le cancer et le surpoids ou l'obésité, il a été récemment montré que certaines protéines pouvaient avoir un impact sur l'appétit et être un simulateur lipogénique chez la souris. C'est pourquoi, nous aimerions comprendre l'impact de ces protéines dans la tumorigénèse. Pour la réalisation de ce projet, l'utilisation d'animaux vivants est indispensable car seul un animal vivant, entier, peut permettre d'étudier la tumorigénèse, l'immunité anti tumorale et le métabolisme. Cet environnement est impossible à reproduire dans toute sa complexité et dans sa régulation *in vitro* ou *ex vivo*. Ce projet se dessine sur 5 ans et implique des études de croissance tumorale et des analyses immunologiques *ex vivo*. Nous utiliserons des souris BALB/c et C57Bl/6 et des souris C57Bl/6 transgéniques (maximum de n. = 3888). Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des expérimentations a été mis au point afin de respecter les exigences de remplacement, réduction et raffinement et permettre une interprétation fiable des résultats dans le respect du bien-être animal. Les expérimentations seront regroupées au maximum afin de réduire le nombre d'animaux contrôles. L'étude sera arrêtée si la procédure initiale invalide l'hypothèse de travail. Plusieurs tissus seront prélevés et soumis à diverses analyses (immunologiques, histologiques ou de biologie cellulaire et moléculaire) pour extraire le maximum de données de chaque expérimentation. Ces tissus seront également partagés avec nos collaborateurs dans le but de réduire le nombre d'animaux utilisés. Les conditions d'hébergement seront conformes à la réglementation et adaptées en accord avec le personnel de l'animalerie (les animaux disposeront de nourriture et d'eau *ad libitum*; le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification). Les animaux seront observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être. La mise en place d'une grille de suivi stricte des points limites permettra d'éviter au maximum le stress et/ou la douleur au cours de l'expérimentation. De plus, le personnel impliqué dans ce projet est qualifié sur le plan technique et formé en continu sur les pratiques d'expérimentation animale. Il assure également une veille scientifique continue, évitant toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature.

15445 Les molécules à visée thérapeutique que nous étudions dans le cadre de notre projet font l'objet d'un intérêt croissant en médecine humaine. Nous avons montré *in vitro* que l'association de deux molécules réduit significativement la prolifération de cellules humaines de cancer du sein réfractaires à tout traitement. L'une d'elles réduit les réserves de molécules nécessaires à la synthèse de l'ADN et ralentit la prolifération des cellules. Chaque cellule subit en permanence des agressions au niveau de son ADN. Afin de transmettre fidèlement ses gènes à ses cellules-filles, des mécanismes de surveillance contribuent à réparer la molécule d'ADN endommagée ou à tuer la cellule si les dommages ne sont pas réparables. La cible de notre deuxième inhibiteur fait partie des acteurs indispensables à ces mécanismes.

Nous émettons l'hypothèse que l'association des deux molécules auxquelles nous nous intéressons pourrait être une nouvelle stratégie dans le traitement de certains cancers. Nous souhaitons déterminer alors si le ralentissement de la prolifération des cellules cancéreuses que nous avons observé *in vitro* après exposition à ces molécules est corrélé à un retard de croissance de la tumeur chez la souris en réponse à ce traitement.

Notre expérimentation comparera des groupes de souris porteuses de tumeurs prélevées chez des patientes atteintes de cancers du sein. Ces groupes de souris recevront soit un traitement avec une seule molécule, soit la combinaison des deux inhibiteurs, soit une chimiothérapie considérée actuellement comme un standard dans le traitement des cancers du sein.

Le plan expérimental a été conçu en prenant en compte la règle des 3R

:  Remplacement ce projet sur un système vivant est nécessaire pour valider nos observations sur cultures cellulaires. L'association de notre inhibiteur de la synthèse des pyrimidines et d'un inhibiteur de Chk1 a montré son efficacité sur la prolifération de modèles cellulaires simples. Il est nécessaire de s'assurer que ces molécules ont un effet similaire sur le développement tumoral dans un système complexe comme un organisme intégré et d'apprécier la sécurité de la combinaison. Les xénogreffes dérivées de tumeurs de patientes chez la souris athymique constituent un modèle

de choix pour étudier la croissance tumorale car elles reflètent les caractéristiques de la tumeur initialement prélevée chez les patientes. [SEP] Réduction Les expériences sur les animaux ont été précédées de nombreuses expériences réalisées sur des lignées cellulaires. Ces mises au point *in vitro* nous permettent de diminuer le nombre d'animaux à utiliser dans les expériences *in vivo*. Nous limitons au maximum le nombre d'animaux par groupe de façon à obtenir des résultats statistiquement fiables. A cause des variabilités inter-animales et intergroupes, un nombre trop restreint d'animaux engendrerait des résultats trop variables et non valides. [SEP] Raffinement Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures ont été mise au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal les points limites ont été établis dans la procédure expérimentale, les animaux seront surveillés quotidiennement, l'hébergement sera modifié par enrichissement du milieu et le nombre d'animaux par cage sera limité.

Ce travail nécessite l'utilisation de 408 souris sur une durée de cinq ans.

15446 Les maladies neurodégénératives comme la maladie de Huntington (MH) sont une préoccupation croissante en santé publique. Malgré d'importants efforts de recherche, il n'existe encore aujourd'hui aucun traitement capable de combattre de façon efficace la progression de ces maladies.

Des nouvelles approches thérapeutiques sont essentielles pour progresser dans la prise en charge des patients. Parmi ces nouvelles approches prometteuses se trouvent la thérapie génique. Elle utilise l'ADN pour soigner ou prévenir de la maladie. Selon la pathologie, cet objectif peut être atteint en délivrant aux cellules un gène à action thérapeutique (transgène) qui surexprime la protéine déficiente dans la maladie. Ces acides nucléiques sont le plus souvent transportés dans les cellules grâce à un vecteur viral.

Nous avons déjà la preuve de concept de notre stratégie dans des modèles murins pour les maladies neurodégénératives suivantes :

-La maladie d'Alzheimer : la surexpression de l'enzyme clé du métabolisme cérébrale du cholestérol à l'aide d'un vecteur (de type AAV=virus adéno-associé) dans les régions précocement atteintes par la pathologie chez des souris modèles (amyloïde et tau) permet de restaurer les déficits mnésiques.

-La maladie de Huntington : La surexpression de cette même enzyme à l'aide d'un vecteur AAV permet de corriger les anomalies neuropathologiques et comportementales chez la souris modèle.

Le but final de l'étude est de compléter toutes les étapes précliniques avant de proposer cette approche thérapeutique chez les patients à un stade précoce de l'évolution de la maladie de Huntington. L'objectif consiste à comparer deux procédés de production différentes pour un vecteur AAV exprimant le transgène d'intérêt. Cette approche permettra de savoir si les deux batch de vecteur AAV-CYP46A1 obtenus par des procédés de productions différentes sont équivalents en terme d'intégration et d'expression du transgène dans un modèle murin de la MH.

Le présent projet a comme objectif de tester la surexpression des vecteurs AAV-CYP46A1 produits avec deux procédés différents dans la MH. Le but est de tester l'efficacité des AAV exprimant le gène thérapeutique (CYP46A1) sous contrôle d'un promoteur qui cible les neurones dans la région cible du cerveau (striatum) du modèle murin pour la MH afin d'évaluer l'effet du traitement sur la neuropathologie et sur les fonctions motrices. De plus, les niveaux de plusieurs biomarqueurs de la MH, présents au niveau du sang seront analysés. A la fin de l'étude les souris seront euthanasiées.

Remplacement : Le recours aux modèles animaux est essentiel car aucun type de culture cellulaire ou système synthétique ne permet à ce jour de reproduire la complexité architecturale des cellules du cerveau en particulier leurs interactions structurelles et fonctionnelles. De plus, les souris Huntington sont bien caractérisées. Tous les vecteurs AAV et les préparations utilisées seront caractérisés *in vitro* avant leur utilisation chez l'animal. Les animaux utilisés dans le cadre de ce projet sont nés et élevés en captivité dans des élevages agréés.

Réduction : Le nombre d'animaux utilisés est optimisé pour obtenir des résultats statistiques. Leur nombre (96) a été restreint au minimum indispensable de façon à obtenir des données nécessaires pour valider l'efficacité d'une stratégie thérapeutique innovante qui peut être considérée comme

cible dans plusieurs maladies neurodégénératives. En effet, des travaux précédents ont permis d'établir les doses de vecteur à injecter et les temps d'analyses.

Raffinement : Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. L'application de critères d'arrêts standards en élevage/utilisation, et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe certifient le bien-être des animaux. De plus, en cas d'observation de la moindre douleur, les souris recevront un traitement analgésique et anti-inflammatoire, et si cette douleur devait persister, les animaux seraient euthanasiés pour éviter toute souffrance.

15447 L'uvéite est une maladie inflammatoire de l'œil qui peut conduire à la cécité chez l'homme. Cette pathologie serait due à une réponse non contrôlée du système immunitaire.

Notre projet vise à étudier le potentiel thérapeutique de nouvelles cibles contrôlant la réponse immunitaire. Le modèle d'uvéite, l'Uvéite Autoimmune Expérimentale (EAU), permet d'étudier la maladie dans un organisme entier qui ne peut pas être dupliqué en utilisant des tissus seuls. Nous avons suivi la règle des 3R en introduisant des points limites à notre protocole. En revanche, et à notre connaissance après une recherche dans plusieurs bases de données de la littérature scientifique, il n'y a pas d'alternative à l'utilisation de modèles animaux pour étudier l'uvéite. En conséquence, nous prévoyons l'emploi d'un modèle murin simple que nous maîtrisons parfaitement au laboratoire et un total de 1200 souris seront nécessaires pour ce projet.

La règle des 3R a été considérée pour la mise en place du projet :

-Remplacement. Les animaux ne peuvent pas être remplacés dans ce type d'expériences. La culture cellulaire, du fait de sa connectivité réduite, ne reproduit pas toutes les propriétés

-Réduction du nombre d'animaux suffisants pour permettre des données statistiquement fiables. Les études *in vivo* développées dans ce projet permettent des approches fonctionnelles sans mise à mort de l'animal permettant un suivi pendant plusieurs semaines réduisant ainsi le nombre d'animaux utilisés

-Raffinement le stress/fatigue/douleur de l'animal est réduit à son maximum par une surveillance quotidienne et l'expérimentation réduit à 4 semaines. De plus, nous utilisons des anesthésiques dans le cas des procédures qui le nécessitent.

15448 Le syndrome d'apnée obstructive du sommeil (SAOS) est un problème de santé publique majeur de par sa prévalence élevée, dans la population générale elle est estimée à environ 2% chez la femme et 4% chez l'homme. La prévalence augmente après la ménopause. Des études épidémiologiques ont mis en évidence que l'obésité est un facteur important du SAOS. Le SAOS est caractérisé par des occlusions partielles ou totales des voies aériennes supérieures (VAS) pendant le sommeil. Cette obstruction est liée à une relaxation inappropriée des muscles dilatateurs des VAS. Les patients présentent également une somnolence diurne excessive. Les traitements typiques incluent de la pression positive continue, des appareils oraux, des interventions chirurgicales modifiant les VAS, et/ou la perte de poids; il n'existe pas de traitement pharmacologique.

Le projet a pour objectif, dans une logique translationnelle de caractériser les mécanismes associés à la mise en place du SAOS en s'appuyant sur des modèles de rongeurs. Les systèmes sérotoninergiques et les hormones sexuelles seront au cœur de nos investigations. Ce projet vise à développer et caractériser un modèle chronique de rongeurs SAOS en vue de tester différentes pharmacologies agissant notamment sur la somnolence.

Les résultats obtenus devraient contribuer à mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques impliqués dans le contrôle central des voies aériennes supérieures. Une meilleure compréhension de l'implication des systèmes sérotoninergiques et des hormones sexuelles, pourrait être un moyen de mieux « phénotyper » les patients et dans le futur offrir une prise en charge plus ciblée.

Notre caractérisation moléculaire et physiologique de souris obèses New Zealand Obese et leurs contrôles New Zealand Black nécessitera l'utilisation d'un total de 64 souris sur une période de 5 ans. Dans la mesure du possible, le remplacement des animaux par des méthodes alternatives

(modèles mathématiques, méthodes *in vitro* ...) est préféré. Dans un souci de réduction du nombre d'animaux utilisés, le design des expériences comportementales et des expériences de physiologie a été calculé au plus juste, en tenant compte de la puissance des analyses statistiques. Toutefois, vu la nature de nos recherches, l'utilisation de rongeurs reste nécessaire. Enfin, le raffinement des méthodes expérimentales visant à réduire à son maximum la souffrance animale est mise en oeuvre grâce à l'utilisation d'anesthésiques et d'antalgiques appropriés lors de chirurgies, à la mise en place de soins post-opératoires et de points limites clairement établis. Les expériences seront menées par des personnels hautement qualifiés dans des locaux d'hébergement respectant les standards en vigueur.

15449 Notre laboratoire développe des colles chirurgicales biocompatibles qui peuvent avoir différentes applications cliniques. Un premier produit a été déjà évalué en clinique en tant que sealant pour être utilisé comme adjuvant aux sutures dans des chirurgies de reconstruction vasculaire.

Nos colles chirurgicales ont également la capacité d'encapsuler des molécules. Ces molécules pourraient être libérées sur le site d'implantation suivant l'indication désirée. Notre projet consiste à évaluer la capacité de nos colles à libérer de façon effective les molécules thérapeutiques.

Après une caractérisation chimique de nos produits, une évaluation de leurs propriétés mécaniques *ex vivo* et une étude de la cinétique de relargage des molécules thérapeutiques *in vitro*, ce projet nous permettra d'effectuer une validation *in vivo*. Les objectifs de ce projet sont les suivants

- 1) analyser la capacité de nos produits à délivrer localement des molécules thérapeutiques
- 2) Etudier le profil de libération des molécules
- 3) Contrôler la tolérance du tissu
- 4) comparer par rapport à des produits déjà commercialisés.

Afin de réaliser ces objectifs, le rat a été choisi comme modèle expérimental pour sa pertinence. Plusieurs groupes de rats seront utilisés et évalués dans le cadre des procédures expérimentales. Il s'agira de procédures expérimentales classiques, dont les bases sont connues et publiées dans des revues spécialisées. Nous utiliserons sur 5 ans un total de 336 rats. La règle des 3R a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée sur le terrain 1) Remplacement quand cela sera possible nous effectuerons des études *ex vivo*, utilisant des organes d'animaux sacrifiés et des abats de boucherie. 2) Réduction le nombre d'animaux utilisés a été rationalisé au maximum tenant compte, quand applicable, des analyses statistiques qui seront effectuées; 3) Raffinement une pré-sélection des produits testés sera effectuée avant les études et les procédures décrites prennent en compte des temps de récupération et un nombre d'essais visant à réduire le stress, la fatigue et la souffrance des animaux

15450 Sur le plan éthique et réglementaire, l'hébergement des animaux doit répondre aux critères sociaux (hébergement en groupe) et comportementaux (exploration, exercice physique, activités cognitives). La structure d'hébergement permet, par son enrichissement, l'expression de ces comportements comme si l'animal se trouvait dans son environnement naturel. Il existe différents types d'enrichissement

- Rouleaux en carton qui sont rongés par l'animal et utilisés pour faire des nids,
- Coton ou boule de coton qui est utilisé dans la confection des nids pour les petits,
- Bâton à ronger qui est utilisé par l'animal pour user les dents.

En effet, les rongeurs ont pour particularité d'avoir des incisives à croissance continue. Il est, de ce fait, important, de mettre à disposition des animaux des outils pour permettre l'usure de dents comme ils le feraient dans la nature en rongant des bouts de bois, graines,

Dans un objectif 3Rs, nous souhaitons enrichir l'environnement des animaux (rat, Sprague Dawley) en introduisant la friandise (noix, noisette et amande) qui leur est distribuée lors d'une manipulation, d'un changement de cage. Cette distribution est un renforcement positif pour l'animal car les manipulations génèrent un stress qui sera réduit quand l'animal comprend qu'en contrepartie, il reçoit une friandise. Ce renforcement positif aide au travail collaboratif entre l'animal et l'opérateur.

Le comportement rongeur est d'autant plus renforcé lorsque l'animal reçoit un fruit à coque entier. Car, il est dans l'obligation de ronger la coque pour pouvoir avoir le fruit. Lors de nos premiers essais, afin de déterminer s'ils avaient une préférence entre la noix, la noisette ou l'amande, nous ont permis d'observer un comportement exploratoire plus important que lorsqu'ils n'avaient que le bâton et les rouleaux. Mais, nous avons aussi pu observer des comportements hiérarchiques plus marqués entre ceux qui décortiquent le fruit à coque et ceux qui le mangent. En parallèle, nous avons constaté que dans les cages où il y avait le fruit à coque, le bâton à ronger n'était plus utilisé par les animaux.

Les objectifs du projet visent à formaliser nos premières observations

-Est-ce que la friandise est plus favorable pour l'usure des dents par rapport au bâton à ronger ?

-Y a-t-il une différence entre le fruit à coque entier ou déjà décortiqué sur l'usure des dents ?

-L'impact des friandises sur le comportement des rongeurs par rapport au bâton à ronger, rouleaux.

Dans le respect des 3Rs

-Réduction L'étude se fera avec des animaux impliqués dans d'autres procédures au fur et à mesure de leur réception.

-Remplacer Nous étudions l'impact de cet enrichissement sur l'usure des dents et leur comportement qui ne peut être modéliser *in vitro*.

-Raffiner Cette étude permettra de voir si les fruits à coque amènent un meilleur enrichissement de l'environnement des animaux en répondant davantage aux critères comportementaux que le bâton à ronger utiliser habituellement.

Chaque groupe sera composé de 12 individus, car notre hébergement est de 4 animaux par cage, donc 3 cages par condition, soit un total de 84 animaux par an donc 420 sur 5 ans.

15451 Les rétinites pigmentaires forment un ensemble de maladies héréditaires rares de la vision caractérisée par une dégénérescence des photorécepteurs et qui affecte des populations jeunes (30 à 40000 personnes en France). La perte de ces photorécepteurs est due majoritairement à la présence de mutations dans des gènes exprimés dans les photorécepteurs eux-mêmes mais également par des mutations causales dans des gènes exprimés dans l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR). Dans cette dernière situation, la perte des photorécepteurs est due au mauvais fonctionnement ou à la dégénérescence de cet EPR. Jusqu'à présent aucun traitement n'est disponible pour ces pathologies. La thérapie génique, qui peut rétablir certaines fonctions des cellules de l'EPR, est une des approches envisagées.

Le protocole est proposé dans le cadre de l'évaluation du bénéfice fonctionnel d'un produit combiné de thérapie génique et cellulaire. Ce produit est un patch de cellules de l'EPR dérivées de cellules souches induites à la pluripotence (cellules iPS) humaines, sur un support biodégradable (polymère L-lactide and caprolactone). Les cellules de l'EPR présentes dans le patch sont à l'origine porteuses d'une mutation dans un gène causant une rétinite pigmentaire, qui a été préalablement corrigée (édition génique) *in vitro*. Ce patch cellulaire sera greffé dans l'espace sous-rétinien d'un modèle de rat présentant une dégénérescence rétinienne (rats RCS). Le bénéfice fonctionnel du patch cellulaire après correction génique sera comparé à celui du même patch avant correction et à un patch formé à partir de cellules de l'EPR sauvages (absence de mutation).

Au total, 74 animaux sont prévus pour cette étude

40 rats RCS, qui développent une dégénérescence des photorécepteurs, seront utilisés pour l'évaluation de l'efficacité du patch cellulaire au cours du temps. 10 rats de la même lignée mais non porteur de la mutation serviront de contrôles.

De plus, 24 rats immuno-déficients (Nude) seront utilisés dans l'évaluation de l'innocuité des cellules du PTC.

Afin de respecter le fondement de la démarche éthique appliquée à l'expérimentation animale la règle des 3R (remplacement, réduction, raffinement) est appliqué pour le déroulement du projet.

Remplacement Ces études chez l'animal sont nécessaires car l'objectif de ce projet est le transfert vers une application clinique et ne peuvent donc être remplacées par des études *in vitro*, qui ne permettent pas de recréer la complexité d'un organisme entier

Réduction Le nombre d'animaux est réduit à son minimum pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. Quand cela est possible, plusieurs tests sont effectués sur les mêmes animaux. Ainsi, l'utilisation de l'imagerie rétinienne (tomographie par cohérence optique) et les approches d'analyses de la fonction rétinienne *in vivo* (test optomoteur et électrorétinogramme) permettront de suivre l'évolution par différentes mesures répétées de la dégénérescence des photorécepteurs au cours du temps sur un même groupe d'animaux (réduisant ainsi le nombre total d'animaux). De même, chaque animal n'est greffé que sur un œil, l'autre servant de contrôle, ce qui réduit d'autant le nombre d'animaux nécessaires pour obtenir des résultats statistiquement significatifs.

Raffinement L'ensemble des procédures a été mise au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal, en limitant la douleur et le stress, tel que l'administration d'analgésiques opioïdes en pré et postopératoire afin de prévenir la douleur éventuelle due aux actes chirurgicaux. Les animaux sont stabulés dans les conditions conformes à la réglementation (deux animaux par cages avec enrichissement, alimentation et abreuvement à volonté, sur des portoirs ventilés). Une signalétique particulière des animaux en expérimentation est utilisée. Une observation régulière des animaux est effectuée pour s'assurer du bien-être des animaux.

Cependant, ces études chez l'animal sont nécessaires car l'objectif de ce projet est le transfert vers une application clinique et ne peuvent donc être remplacées par des études *in vitro*.

15452 Avec 44 872 nouveaux cas estimés en 2017 le cancer colorectal représente la deuxième cause de décès par cancer en France. Le cancer du côlon se développe à partir des cellules épithéliales qui tapissent la paroi interne du côlon. Suite à l'apparition de mutations génétiques les cellules se transforment et se multiplient de façon anarchique, entraînant la formation de tumeurs. C'est le cas du gène suppresseur de tumeur Apc qui est retrouvé muté dans 85% des cas de cancer colorectal. Dans ce contexte-là, nos résultats préliminaires suggèrent que l'apparition d'une telle mutation génétique, entrainerait des modifications du microbiote ayant pour conséquence, l'activation du système immunitaire favorisant le développement des tumeurs.

Ce projet sera mené selon les modalités du principe de remplacement, de réduction et de raffinement « règle des 3R ». (1) Ce projet fait intervenir plusieurs composantes de l'intestin, le microbiote, le système immunitaire intestinal et les cellules tuft, nécessitant donc l'utilisation de modèles intégrés tel que des modèles murins transgéniques. (2) L'élevage des animaux se fera dans un milieu enrichi (maisonnette, carrés de cellulose) sous la supervision de personnels qualifiés des animaleries. Les animaux feront l'objet d'un suivi scrupuleux des points limites, en utilisant une grille d'évaluation spécifique. Toutes altérations de l'état général des animaux ainsi que des signes de douleur entraineront une prise en charge adaptée. (3) Le nombre d'animaux requis pour ce projet a été défini selon une approche statistique rigoureuse permettant d'atteindre nos objectifs scientifiques et ainsi minimiser le nombre d'animaux à utiliser. Nous utiliserons des animaux des deux sexes sans a priori, ceci permettant de réduire le nombre d'individus à produire. Chaque cohorte sera optimisée de façon à réaliser un maximum de prélèvement (Tissus intestinal pour extraction ARN, ADN et protéine et pour analyse histologique, prélèvement du caecum et des fèces pour analyse du microbiote) pour répondre à un maximum de question avec une seule cohorte. Nous utiliserons 3 lignées transgéniques différentes, pour un total de 390 souris.

15453 L'ischémie myocardique est à l'heure actuelle une des principales causes de décès dans le monde. L'ischémie survient lorsque le myocarde ne reçoit plus l'oxygène dont il a besoin par l'apport sanguin. L'agression tissulaire hypoxique qui en résulte peut avoir des conséquences dramatiques et laisser des séquelles indélébiles. Lorsque la perfusion est restaurée et l'oxygénation tissulaire à nouveau possible, on observe alors une forte réaction inflammatoire associée à une production élevée des radicaux oxygénés qui ont un effet néfaste sur les cellules cardiaques. Cet effet paradoxal et indésirable de la restauration de la perfusion constitue le syndrome de reperfusion. La dénomination "Ischémie-Reperfusion" rappelle que les dégâts tissulaires liés à une interruption ou

une réduction du flux sanguin, sont le résultat de deux phénomènes l'effet de l'hypoxie-ischémie et l'effet de la reperfusion-réoxygénation.

A l'heure actuelle il existe très peu d'options thérapeutiques pour réduire ces lésions de reperfusion. Une de ces options est basée sur l'administration de l'adénosine. En essai clinique, l'adénosine a montré un fort effet cardioprotecteur. Cet effet bénéfique était obtenu après l'administration des doses élevées d'adénosine, car celle-ci est rapidement métabolisée dans l'organisme (demi-vie de 2 à 10 secondes). Les doses élevées ont induit également des effets secondaires indésirables aboutissant à l'arrêt des essais cliniques.

Pour contourner ces limitations nous avons développé des nanomédicaments à base de squalène, une molécule naturellement présente dans l'organisme et donc bien tolérée. Il a été précédemment démontré que les nanoparticules de squalène couplé à l'adénosine (Sq-Ade) induisaient un fort effet neuroprotecteur chez la souris avec une ischémie cérébrale. Par ailleurs nos études effectuées chez la souris avec une ischémie/reperfusion cardiaque ont montré un effet cardioprotecteur chez les souris ayant reçu ces nanomédicaments.

Le projet actuel vise à évaluer l'accumulation des nanomédicaments au niveau du cœur dans un modèle d'ischémie/reperfusion myocardique. Nous espérons que les nanomédicaments de Sq-Ade auront une accumulation préférentielle dans le cœur ischémique par rapport au cœur sain.

La validation d'un nouveau nanomédicament nécessite la mise en place d'expériences chez des animaux. Les lésions d'ischémie/reperfusion myocardique sont associées à une forte réaction inflammatoire. Toutes ces modifications ont des répercussions sur le cœur entier non seulement au niveau structural mais également au niveau physiologique (cycle cardiaque, contractions des cellules cardiaques). Les études *in vivo* nous permettent d'évaluer un effet dans le temps au niveau de l'organe entier mais également de tenir compte de la réponse immunitaire.

Pour éviter qu'un nombre trop important d'animaux soit utilisé, nous avons choisi le rat au lieu de la souris car le dosage des nanomédicaments dans le cœur nécessite des grandes quantités de tissu cardiaque et le rat a un cœur 10 fois plus gros que la souris. Le dimensionnement des groupes expérimentaux a été calculé grâce à un logiciel afin d'utiliser le minimum d'animaux tout en pouvant mettre en évidence les éventuels effets. Ainsi pour l'ensemble de cette étude 60 rats sont nécessaires.

Le bien-être des animaux (raffinement) est également respecté. Les conditions d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance ou angoisse que pourraient ressentir les animaux. Des anesthésiques et des antalgiques seront utilisés pour exécuter toute intervention douloureuse.

Bénéfices attendus cette étude nous permettrait d'évaluer de manière précise la cinétique d'accumulation des nanomédicaments dans le cœur dans un modèle d'ischémie/reperfusion.

15454 La radiothérapie (et plus particulièrement la protonthérapie) est une des options thérapeutiques les plus importantes dans le traitement des cancers. C'est en effet l'une des méthodes les plus efficaces et les plus utilisées pour traiter les cancers car au moins 50% des patients atteints d'un cancer seront traités par radiothérapie durant leur maladie. Le principal défi de la radiothérapie est de parvenir à déposer une dose curative dans la tumeur tout en s'assurant que les tissus sains environnants soient préservés. Ceci est d'autant plus crucial pour les tumeurs radiorésistantes comme le sont les carcinomes (tumeurs pulmonaires). En effet, dans ce cas la radiothérapie ne peut être que palliative car pour parvenir à une dose de radiation curative, le risque de dommages graves aux tissus sains est trop élevé.

Dans ce contexte, notre objectif principal s'inscrit dans l'amélioration des traitements de radiothérapie. Pour ce faire, nous explorons de nouvelles approches et nous proposons de développer des techniques innovantes utilisant de nouvelles modalités de traitement. Ainsi, nous nous focaliserons sur des techniques innovantes qui ont montré dans des études préliminaires un intérêt significatif dans la préservation des tissus sains (même à des doses très élevées) ainsi qu'un effet très intéressant sur le contrôle de la croissance tumorale chez le petit animal. Ces études seront complétées ici pour valider l'efficacité de ces nouvelles techniques de radiothérapie en

comparaison à celle utilisée actuellement chez le patient. Nous nous focaliserons particulièrement sur l'effet de l'irradiation sur les poumons sains.

Dans le cadre de ce projet, des études *in silico* ont déjà été réalisées pour obtenir un maximum de données préliminaires. Il nous est maintenant indispensable de poursuivre ces travaux chez un organisme vivant intégré.

Ce projet nécessitera l'utilisation de 50 souris. Ce nombre a été statistiquement défini pour permettre l'obtention de résultats fiables avec le moins d'animaux possible.

Une grille de score a été établie pour évaluer de façon objective l'état de l'animal et de prendre les mesures adéquates pour arrêter immédiatement sa souffrance.

Dès l'irradiation, l'alimentation usuelle des animaux sera complétée par des aliments gélifiés et des petits granulés disposés directement dans le fond de leur cage. L'accès à la nourriture sera ainsi plus aisé. Par ailleurs et en accord avec les recommandations internationales dans le domaine de la cancérologie, les conditions d'hébergement des animaux sont optimisées pour limiter leur stress.

15455 L'insomnie primaire est un trouble du sommeil diagnostiqué chez près de 15% de la population se traduisant par des difficultés d'endormissement et des réveils nocturnes. De nos jours, le traitement de première intention préconisé par la société internationale de sommeil est la thérapie comportementale et cognitive. Cette approche empirique s'appuie néanmoins sur des études réalisées chez l'homme et l'animal montrant que le sommeil pourrait être conditionné. L'existence d'un tel conditionnement impliquerait que les centres de régulation du cycle éveil-sommeil soient sous le contrôle de structures cérébrales à la base des processus de conditionnement telles que l'amygdale ou le cortex préfrontal.

L'une des principales structures responsables de l'endormissement connue est le noyau préoptique ventrolatéral (VLPO). Afin de mieux comprendre comment le sommeil est régulé, il est important de mieux décrire comment l'activité des neurones du VLPO peut être influencé. Nos études préliminaires nous amènent à penser que des structures cérébrales comme les Septum Latéral et Médian pourraient être impliqués dans la modulation de l'activité des neurones du VLPO et par conséquent, pourraient être impliqué dans la régulation du sommeil.

Ces nouvelles données nous amènent à poursuivre nos expériences afin d'évaluer la part des projections corticales vs septales dans les effets sur le sommeil que nous avons observés. Par conséquent, nous réaliserons dans un premier temps des études anatomiques afin de décrire précisément les réseaux des neurones du cortex et du septum qui projettent au VLPO. Puis grâce à des outils d'opto-génétiques nous testerons *in vivo* et *in vitro* les effets de l'activation de cette projection septum-VLPO respectivement sur les états de sommeil et sur l'activité neuronales des neurones du VLPO.

La caractérisation de la nouvelle voie neuronale que nous proposons d'étudier ne peut pas être réalisées *in silico* via des modèles mathématiques (Remplacer). Ces expériences nécessitent d'utiliser la souris qui est le modèle adéquat.

Les expériences ont été pensées de façon à réduire au maximum le nombre d'animaux requis pour ces expériences (Réduire). Ce nombre sera gardé au minimum nécessaire afin de pouvoir réaliser des tests statistiques sur les résultats obtenus et ainsi permettre leurs interprétations. De plus, certaines parties de notre étude seront réalisées *in vitro* afin de raffiner nos expériences et de réduire le nombre d'animaux. Enfin, les expériences ont été pensées pour répondre à la question scientifique tout en réduisant au maximum l'inconfort de l'animal. En effet, des anesthésiques locaux et généraux ainsi que des traitements analgésiques appropriés seront utilisées tout au long des procédures afin de préserver le bien-être des animaux (Raffiner). Le projet sur 5 ans comprend 12 groupes expérimentaux et un maximum de 186 souris.

15456 La Sclérose en Plaques (SEP) est une pathologie inflammatoire du système nerveux central (SNC) complexe. D'origine auto-immune, la pathologie évolue dans la grande majorité des cas par poussées inflammatoires, au cours desquelles une de nombreux lymphocytes dits auto-réactifs, programmés pour détruire la myéline, envahissent le SNC. La myéline est une substance riche en

lipides qui entoure les prolongements neuronaux, les protégeant des atteintes extérieures et accélérant la transmission des influx nerveux. En dehors des poussées, la myéline se reconstruit partiellement, permettant une régression des symptômes associés. C'est ce qu'on appelle la phase de poussées/rémissions (ou RR-SEP pour relapses/remitting en anglais) de la pathologie, contre laquelle plusieurs solutions thérapeutiques, visant à empêcher l'inflammation délétère, sont aujourd'hui disponibles. Cette phase RR peut durer 5 à 20 ans, avec des espacements variables entre les poussées. Elle est néanmoins quasi systématiquement suivie d'une phase dite progressive (P-SEP), où les périodes de rémissions disparaissent et un handicap permanent s'installe et s'aggrave progressivement. Dans de rares cas, les symptômes apparaissent directement progressivement pour s'aggraver avec le temps, c'est ce qu'on appelle la forme primitivement progressive (de plus mauvais pronostic). Dans les 2 cas, la myéline n'est alors plus réparée et les neurones sensibilisés dégénèrent. Les lymphocytes T auto-réactifs responsables de la RR-SEP ne sont plus indispensables à la progression de la pathologie, qui ne répond pas aux traitements disponibles. Il y a donc une urgence à mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu dans la P-SEP afin de définir de nouvelles thérapies adaptées.

En plus d'une mort des oligodendrocytes, les cellules qui synthétisent la myéline, par apoptose, la P-SEP présente des caractéristiques proches des maladies neurodégénératives classiques, comme la maladie de Parkinson ou d'Alzheimer, à savoir une dégénérescence neuronale associée à une réaction inflammatoire locale des astrocytes et de la microglie. Un point commun aux neurones dégénératifs et aux cellules neuroinflammatoires est une modification de leurs activités métabolique et transcriptionnelle. Dans ce projet, nous souhaitons étudier l'impact de facteurs de transcription sensibles au stress cellulaires et contrôlant l'expression de nombreux gènes du métabolisme et de la survie cellulaire, à la fois dans les neurones et les cellules immunitaires au cours de la P-SEP. Nous espérons ainsi améliorer notre connaissance de la physiopathologie de la P-SEP et proposer de nouvelles pistes thérapeutiques.

Nous possédons pour cela des lignées de souris déficientes pour ces facteurs de transcription, que nous soumettrons à un modèle de P-SEP par intoxication avec une substance entraînant la mort des oligodendrocytes par une atteinte mitochondriale ainsi que toutes les autres caractéristiques de la pathologie.

Ainsi, le recours à l'utilisation de souris est indispensable à notre étude. Pour l'ensemble du projet, il est prévu d'utiliser un maximum de 3020 souris en 5 ans et d'appliquer la règle des 3R comme suit

1- Remplacement. La force de ce projet est de pouvoir faire une analyse exhaustive des fonctions métaboliques et des interactions cellulaires chez l'animal au cours du développement de la pathologie. Le recours à des expériences *in vitro* ne permettent pas d'appréhender l'intervention temporelle des différents types cellulaires impliqués, ni d'en définir l'état métabolique en situation. De plus, les interactions cellulaires et la régulation métabolique fine de ces cellules ne peut être compensée par l'utilisation de lignées cellulaires immortalisées. Néanmoins, une fois que nous aurons validé ces points chez l'animal, l'analyse des mécanismes moléculaires sera approfondie à partir de cultures primaires de neurones, d'oligodendrocytes et de cellules immunitaires (microglie, lymphocytes).

2- Réduction. Nous planifierons chaque expérience pour minimiser le nombre d'animaux tout en permettant une analyse statistique fiable de nos résultats. Nous utiliserons des groupes de 5 souris par expérience et nous répéterons les expériences 3 fois afin de rendre nos résultats exploitables. Chaque fois que cela sera possible, nous analyserons un maximum de paramètres cellulaires et moléculaires sur les mêmes individus afin de limiter le nombre d'expériences *in vivo*.

3- Raffinement. Le bien-être des animaux sera suivi tout au long de nos expériences et fait l'objet de procédures strictes. Les souris seront toujours hébergées en groupes dans des cages de surface suffisante, avec alimentation et eau *ad libitum*. Une procédure est mise en place en accord avec le comité de suivi du bien-être animal de notre établissement pour limiter la douleur, la souffrance ou l'angoisse de l'animal. Les cages sont systématiquement enrichies (coton pour le nid, tunnel) et les animaux surveillés quotidiennement, permettant de détecter toute anomalie. Un animal sera euthanasié s'il présente une prostration continue, une déshydratation ou une perte de poids

supérieure à 20%. L'angoisse des animaux sera limitée par des périodes d'acclimatation à l'hébergement comme à la manipulation. La douleur liée à l'expérimentation sera limitée par l'utilisation systématique d'analgésiques et sous anesthésie générale. De plus, les responsables du projet ont été formés à l'utilisation des animaux à des fins scientifiques et garantissent de la formation et l'encadrement des autres expérimentateurs impliqués dans les procédures expérimentales. L'apprentissage et la maîtrise des gestes techniques sont reportés dans les livrets de compétences des personnes concernées.

15457 L'incidence de l'obésité sévère et des complications métaboliques associées est en constante augmentation, constituant un problème de santé publique majeur au niveau mondial. L'obésité est un facteur de risque de développement de complications cardiométaboliques comme le diabète de type 2, notamment en raison altérations tissulaires et d'une inflammation systémique chronique dite « de bas-grade ». Par ailleurs, l'altération de la composition et de la fonctionnalité des bactéries peuplant notre intestin, appelé microbiote intestinal, semble également être un élément clé dans ce contexte. En effet, on note notamment une diminution du nombre d'espèces bactériennes ainsi que des modifications fonctionnelles du microbiote intestinal en situation pathologique telle que le diabète de type 2 ou l'obésité sévère.

Parmi les nombreux paramètres physiologiques modulés par le microbiote intestinal, on trouve notamment la biodisponibilité des vitamines. Ainsi, l'altération de la production bactérienne des vitamines B pourrait avoir un impact sur le statut inflammatoire et métabolique de l'hôte, mais aussi affecter les populations bactériennes dépendantes de ces nutriments. De plus, des études ont mis en évidence un lien net entre déficit en vitamines et augmentation de l'inflammation chez des patients sévèrement obèses.

Par ailleurs, des résultats préliminaires ont montré que chez des patients atteints d'obésité, les taux circulants de certaines vitamines étaient diminués suggérant donc un déficit en vitamines dans un contexte de pathologie métabolique. Notre hypothèse est donc que dans un contexte d'obésité et d'altérations métaboliques, un déficit en vitamines, et plus particulièrement celles du groupe B, participerait à l'altération du microbiote et à l'inflammation observées dans ces pathologies.

L'objectif de notre projet est donc d'étudier les effets d'une supplémentation en vitamine B sur le statut métabolique et inflammatoire de l'hôte dans un contexte d'obésité induite par régime riche en lipides (HFD). Pour différencier (a) l'effet systémique des vitamines de (b) l'impact sur le microbiote et de ses retentissements systémiques, nous utiliserons deux modes d'administration : (i) en diffusion continue grâce à un système de pompe osmotique, (ii) en enrichissement dans le régime. Nous considérons également un groupe contrôle nourri par régime standard ainsi qu'un groupe d'animaux nourris par HFD et chez lesquels des pompes osmotiques diffusant une solution véhicule seront implantées. Au total, 40 animaux seront considérés pour cette étude.

Vis à vis de la règle des 3R, et notamment du remplacement, l'étude de l'écosystème microbien digestif et son impact sur les maladies métaboliques ne peuvent pas être réalisés *in vitro*. En effet, la majorité des bactéries digestives ne survivent en dehors de leur hôte, en l'occurrence la souris, ce qui nécessite le recours au modèle murin. De plus, les grandes fonctions systémiques (immunité, inflammation) participent de manière très importante au développement des désordres métaboliques, qui ne saurait donc être évaluée en l'absence de ces systèmes. La souris est l'espèce choisie dans la majorité des études antérieures portant sur les maladies métaboliques. Les souris sont faciles à manipuler et les administrations orales bien maîtrisables; de plus, la présence de notre établissement utilisateur sur le site nous permet d'utiliser ce modèle dans de bonnes conditions d'expérimentation. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, le design expérimental présenté ci-dessus correspond au nombre minimal de groupes et de souris nécessaires afin d'obtenir des résultats scientifiquement pertinents et statistiquement fiables. 10 souris par groupe « traitement » est le nombre minimal permettant d'obtenir des résultats statistiquement fiables compte tenu de la variabilité interindividuelle des paramètres mesurés (poids, tolérance au glucose, sensibilité à l'insuline).

En ce qui concerne le raffinement du protocole, l'ensemble des manipulations effectuées sur les animaux sont de classe légère à modérée. Nous prendrons soin de les faire exécuter par des

personnes expérimentées et compétentes afin de réduire la sévérité et l'intensité de la douleur, ainsi que le stress généré au maximum. Nous avons également choisi un matériel et des procédures adéquats pour limiter la douleur et le stress, avec en particulier l'utilisation des sondes de gavage en plastique fines et souples lorsque nécessaires pour l'administration de solutions. Un suivi hebdomadaire de prise alimentaire et du poids sera réalisé, ce qui permet, en plus des données expérimentales, de s'assurer du bon état de santé des animaux ainsi que de les habituer aux manipulations et ainsi de générer moins de stress lors des procédures ultérieures (tests de tolérance au glucose et de sensibilité à l'insuline). De plus, un laps de temps de minimum 1 semaine entre les procédures de classe modérée sera respecté afin de laisser un temps de récupération aux animaux.

15458 Les troubles envahissants du développement, dont les troubles du spectre autistique (TSA), représentent une maladie neurodéveloppementale dont la prévalence ne cesse d'augmenter et dont on ne connaît pas encore suffisamment la physiopathologie pour développer des stratégies thérapeutiques. L'objectif du projet est de prévenir et/ou corriger le phénotype autistique social et moteur dans un modèle animal environnemental de l'autisme déjà caractérisé (souris gestantes injectées avec de l'acide valproïque (VPA) avec une approche nutritionnelle (nutriments lipidiques de type acides gras polyinsaturés (AGPI). Nous caractériserons ensuite les changements au niveau anatomique, cellulaire et moléculaire. Ce projet pourrait permettre de proposer de nouvelles solutions thérapeutiques et pharmacologiques dès les premières suspicions de TSA, c'est-à-dire dès la gestation et les premiers mois suivant la naissance. Notre projet se divise en deux parties la prévention et la correction des symptômes de TSA. Pour le premier point, nous allons proposer de la nourriture riche en AGPI de type omega 3 (AGPI n-3) aux femelles gestantes dès le début de la gestation jusqu'au sevrage de la descendance (28 jours). Quant à la correction des symptômes de TSA, nous donnerons cette même nourriture directement à la descendance du sevrage au sacrifice (7 semaines). Le groupe contrôle aura à sa disposition une nourriture équilibrée en AGPI, isocalorique, identique en tous points à la nourriture riche en AGPI en n-3, mis à part la teneur en lipides. L'impact du traitement VPA et du type de nourriture sera également étudié sur les mères.

Une attention particulière est portée afin d'être en conformité aux 3R.

Remplacer Ces approches nécessitent la présence du réseau neuronal qui est uniquement accessible dans des modèles d'animaux intègres et donc vivants. Il n'est donc pas envisageable d'utiliser des méthodes de substitution à l'animal entier.

Réduire nous utilisons des tests statistiques de puissance afin de réduire au maximum le nombre d'animaux tout en nous permettant d'obtenir des résultats statistiquement exploitables.

Raffiner (i) nous avons planifié nos expériences en gardant à l'esprit la nécessité de réduire sinon de soulager l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'angoisse, et (ii) le bien-être des animaux sera pris en compte à chaque étape du projet par une surveillance quotidienne des animaux et l'apport d'enrichissement (éléments de nidification).

Pour la réalisation de ce projet, nous avons besoin de 756 souris.

15459 Au cours d'une inflammation, certains globules blancs, les monocytes, sont rapidement recrutés dans les tissus pour constituer la première ligne de défense du système immunitaire. Ces monocytes se différencient dans les tissus en macrophages ou cellules dendritiques, qui ont des rôles différents dans les réponses immunitaires les cellules dendritiques activent les autres cellules du système immunitaire, tandis que les macrophages permettent la réparation des tissus. Cependant, dans les maladies autoimmunes inflammatoires (comme la sclérose en plaque, l'arthrite rhumatoïde ou la maladie de Crohn), ces cellules dendritiques dérivées de monocytes ont un rôle néfaste en entretenant la réaction inflammatoire inadéquate.

Les mécanismes de différenciation des monocytes restent mal caractérisés. En particulier, on ne connaît pas bien les molécules responsables de l'expression des gènes importants pour cette différenciation.

Dans une première étude *in vitro*, nous avons mis en évidence que deux molécules jusqu'ici mal connues sont essentielles pour permettre la différenciation des monocytes en cellules dendritiques. Afin de déterminer la pertinence physiologique de nos observations, et donc leur application clinique potentielle, il est désormais nécessaire d'utiliser un modèle *in vivo*.

Nous utiliserons des souris C57BL/6 qui sont un modèle classique et largement accepté par la communauté scientifique internationale. Afin d'étudier la différenciation *in vivo* de monocytes n'exprimant pas nos molécules d'intérêt, nous injecterons aux souris des cellules souches de la moelle osseuse (qui pourront ensuite devenir des monocytes) issues de souris normales ou de souris génétiquement modifiées pour ne pas exprimer chacune de nos molécules d'intérêt. Pour permettre cette greffe de moelle osseuse, les souris receveuses seront préalablement irradiées aux rayons X pendant 5 min. Cette procédure n'est pas douloureuse. Afin d'étudier le potentiel de notre découverte dans le traitement de la sclérose en plaque, nous utiliserons également un modèle expérimental pour cette maladie, en injectant un produit déclenchant une pathologie similaire dans les souris.

Ce projet répond aux exigences de remplacement, réduction et raffinement. Un maximum de 90 animaux sera utilisé pour ce projet. Pour chaque expérience, nous utiliserons le minimum d'animaux permettant d'obtenir des résultats statistiquement fiables et scientifiquement valides. De plus, chaque animal sera utilisé pour analyser les cellules du système immunitaire dans différents organes, ce qui permettra d'optimiser les données obtenues sur chaque animal. Aucun prélèvement ne sera réalisé sur les souris vivantes. Les animaux seront suivis quotidiennement afin d'assurer leur bien-être et les expérimentations sont arrêtées avant la souffrance des animaux.

15460 La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) est une pneumopathie interstitielle fibrosante caractérisée par l'accumulation de tissu conjonctif dans les poumons conduisant à une insuffisance respiratoire restrictive d'évolution fatale. En l'absence de traitement efficace, la médiane de survie à partir du diagnostic de FPI est d'environ 3 ans avec une évolution de la maladie variable selon les patients. La FPI est très souvent associée aux apnées du sommeil qui sont caractérisées par des pauses respiratoires récurrentes dues à un rétrécissement /collapsus des voies aériennes supérieures et/ou à un arrêt périodique du réseau respiratoire ponto-bulbaire au cours du sommeil, conduisant à des épisodes répétés d'hypoxie-réoxygénation. Ces apnées nocturnes constituent un stress d'hypoxie intermittente chronique (HIC), particulièrement délétères du fait du stress oxydant et de l'inflammation de bas grade qu'elles génèrent. Dans une étude récente du laboratoire, nous avons montré dans un modèle murin de fibrose induite par la bléomycine que l'HIC conduisait à une surmortalité des souris ainsi qu'à une aggravation de la fibrose pulmonaire avec une accumulation de collagène pulmonaire se traduisant par une altération de la mécanique ventilatoire. D'autre part les premiers résultats obtenus sur un modèle murin de pathologie pulmonaire aiguë induite à la bléomycine suggèrent également une modification de la mécanique ventilatoire affectant les échanges gazeux au niveau pulmonaire se traduisant par une diminution de la saturation. Ces résultats sont conformes à ce qui est observé dans les pathologies pulmonaires interstitielles pour lesquelles on observe une dyspnée, une atteinte des régulations ventilatoires caractérisées par une faible valeur de capacité vitale forcée associée avec une augmentation de la fréquence respiratoire et une diminution du volume courant. Il a également été rapporté une diminution de la réponse ventilatoire à l'hypercapnie chez des patients souffrant de fibrose pulmonaire. Les mécanismes à l'origine des anomalies du contrôle ventilatoire au cours des pneumopathies fibrosantes sont aujourd'hui peu connus, en particulier les rôles potentiels de l'inflammation (systémique, pulmonaire et neuronale) et de la fibrose pulmonaire. L'association fréquente à un syndrome d'apnées du sommeil peut également être impliquée.

Les objectifs visés dans ce projet sont doubles. Tout d'abord, l'objectif est d'étudier les effets physiologiques, cellulaires et moléculaires de l'HIC sur le développement de la fibrose pulmonaire et de documenter l'implication du stress du reticulum endoplasmique dans la modulation du stress oxydant qu'elle génère. Parallèlement, nous envisageons de caractériser les conséquences à long terme de la fibrose et/ou de l'hypoxie intermittente sur la fonction ventilatoire et sur la plasticité neuronale du réseau respiratoire ponto/bulbaire. Ce projet nécessitera l'utilisation de 690 souris sur

3 ans et se fera en accord avec la règle des 3R. Les hypothèses qui seront étudiées nécessitent l'induction d'une fibrose pulmonaire. De plus, il n'existe pas à ce jour de méthode alternative à l'expérimentation *in vivo* pour étudier l'impact de l'hypoxie intermittente sur les mécanismes de fibrogenèse pulmonaire ni pour l'étude de la commande centrale respiratoire. L'utilisation d'un modèle murin ne peut donc être remplacé. Le nombre d'animaux a été limité au minimum pour obtenir une puissance statistique suffisante. Un suivi quotidien sera mis en place pour éviter toute souffrance inutile des animaux et des points limites les plus précoces possible en fonction de l'objectif de l'expérimentation seront établis.

15461 Notre équipe de recherche étudie les mécanismes d'ossification pathologique dans le cadre des spondylarthrites. Il s'agit de pathologies articulaires caractérisées par l'inflammation et l'ossification des enthèses. Il s'agit de la zone où les tendons et ligaments s'attachent à l'os. Notre projet actuel vise à explorer le rôle de la stimulation mécanique, donc de l'exercice, dans cette ossification pathologique. Nous souhaitons développer un modèle *in vivo* pour compléter des résultats que nous avons déjà obtenus à partir d'analyses *in vitro*, en culture cellulaire. Le protocole expérimental proposé ici n'est pas pathologique. Des souris adultes, saines, seront placées en cage d'activité, avec une roue et un compte-tour adapté. Les souris avec exercice seront comparées à des souris hébergées dans des conditions standards. L'accès à la roue est libre pendant 2 semaines, il s'agit d'un exercice de course volontaire. On s'assurera du bien-être des animaux tout au long de l'expérimentation. 36 souris seront nécessaires pour mener à bien notre étude, ce nombre étant requis pour faire l'analyse statistique qui nous permettra de valider nos résultats. Conformité à la règle des 3 R : c'est un protocole qui n'induit aucune douleur ou mal être. Le nombre d'animaux nécessaire à cette étude (36 souris) a toutefois été calculé au plus juste afin d'offrir la puissance statistique maximum. Un enrichissement du milieu de vie à l'aide d'igloos en carton et de ouate de cellulose (permettant au souris de se fabriquer un nid) sera mis en oeuvre pour l'hébergement des souris.

15462 Le traitement du cancer du sein à l'aide d'anticancéreux présente un enjeu de santé public majeur. Dans ce contexte, nous avons récemment démontré que la morphine affectait de manière dramatique la potentialisation et la dégradation du tamoxifène, un anticancéreux de référence pour le cancer du sein. En plus de ce composé, l'anastrozole est le deuxième anticancéreux le plus utilisé. De manière surprenante, bien qu'ils possèdent un métabolisme commun, la morphine, la codéine et/ou le paracétamol et l'anastrozole sont utilisés conjointement chez les patients. A l'heure actuelle, l'impact de ces analgésiques sur la dégradation de cet anticancéreux n'a jamais été étudié. Notre but est d'établir si la morphine et/ou codéine et/ou le paracétamol possèdent des effets bénéfiques ou délétères sur l'inactivation de l'anastrozole *in vivo*.

Adéquation avec la règle des 3R

Remplacer Les modèles de culture cellulaire se heurtent à une transposition dans les modèles intégrés. Dans notre cas, la notion de cancer du sein est uniquement applicable dans un modèle intégré et donc chez un animal. C'est pour cette raison qu'une approche *in vivo* sur des souris est nécessaire.

Réduire Un total de 264 souris C57BL/6J femelles sera utilisé lors de ces études. Ce nombre correspond au nombre minimal d'animaux par groupe permettant de mettre en évidence une différence statistique.

Raffiner Les animaux sont placés en cage par groupe de 5 individus. Ils seront maintenus dans un environnement enrichi selon les procédures en vigueur à l'animalerie (barre de bois à ronger, nid) qui permet un bien-être optimal des animaux (procédures en vigueur à l'animalerie). D'autre part, nous avons établi des points-limites prédictifs permettant de soustraire l'animal à la souffrance.

Un nombre total d'animaux à tester de 264 souris a été établi et se base sur les approches nécessaires au projet.

15463 L'objectif de notre projet de recherche est de développer de nouvelles thérapies pour traiter le cancer. Le cancer reste un des problèmes majeurs de Santé Publique et son incidence est encore très élevée en dépit des recherches intensives menées. Notre intérêt se porte sur les protéines de choc thermique (HSP pour « Heat-Shock Protein ») et leurs implications dans le développement tumoral. Ces protéines jouent un rôle essentiel dans la protection cellulaire contre les agressions, mais aussi dans le métabolisme cellulaire en dehors de tout stress. Cibler les protéines de choc thermique, en particulier la protéine HSP110, est une stratégie émergente et prometteuse en thérapie anticancéreuse du fait que HSP110, qui est constamment exprimées dans la cellule cancéreuse, a un rôle essentiel dans la prolifération des cellules cancéreuses et leur résistance aux agents chimiothérapeutiques, favorisant ainsi le développement tumoral. Compte tenu du rôle clé d'HSP110 dans le cancer, il y' a un intérêt évident à développer des inhibiteurs spécifiques. Nous disposons de 2 composés chimiques et avons développé en lien avec une entreprise 2 autres inhibiteurs capables de lier spécifiquement HSP110. Nous devons maintenant confirmer l'efficacité des composés sur le ralentissement de la croissance tumorale *in vivo* et comprendre leur impact sur l'activité des cellules du système immunitaire localisées au sein du microenvironnement tumoral et qui contribue à l'élimination des cellules cancéreuses. Enfin, nous pourrions vérifier que ces composés n'aient pas d'effets néfastes sur l'animal. Nous allons aussi démontrer chez la souris, les effets anticancéreux en association avec la chimiothérapie standard et des traitements plus novateurs appelés immunothérapie. Cela constituera la première étape préclinique nécessaire pour ces candidats médicaments.

Un autre point intéressant sur HSP110 est qu'elle est sécrétée et abondante dans le microenvironnement tumoral, au sein de nanovésicules (exosomes) qui sont sécrétées par les cellules cancéreuses et également sous forme libre. Bien que la fonction extracellulaire de HSP110 soit peu connue, nous avons démontré qu'HSP110 extracellulaire active des cellules bloquant l'immunité contre la tumeur. Nous chercherons dans un premier temps à identifier l'impact des exosomes présentant HSP110 sur la croissance tumorale en injectant chez des souris porteuses de tumeurs des exosomes purifiées provenant de cellules cancéreuses exprimant ou non HSP110. Ces exosomes semblent impliqués dans la progression tumorale, mais actuellement aucun mécanisme impliquant la protéine HSP110 n'a été mis en évidence.

En résumé, nous souhaitons explorer 2 axes dans ce projet

- Thérapie anticancéreuse, mener nos inhibiteurs d'HSP110 en clinique.

Nous étudierons l'impact des inhibiteurs seuls ou associés aux traitements chimiothérapeutiques standards et aux immunothérapies sur la croissance tumorale.

- Implication des exosomes contenant ou non HSP110 dans la croissance et la progression tumorales.

L'injection d'exosomes cancéreux dans des souris porteuses de tumeurs, permettra également de déterminer si les exosomes contribuent à la progression de la masse tumorale et si cet effet est dépendant ou non de la présence d'HSP110.

Afin de respecter la règle des 3 R (remplacement, réduction, raffinement), nous étudierons les voies signalétiques impactées en traitant avec nos inhibiteurs de la protéine HSP110 les cellules cancéreuses et les cellules du système immunitaire (cellules issues de sang de donneur humain ayant donné leur consentement) *in vitro* (remplacement). HSP110 semble être un marqueur universel de cancer. Nous travaillerons avec diverses cellules de cancers qui seront injectées aux souris (modèles de cellules dérivées de cancers colorectaux, de la peau, de lymphome). Les expériences seront réalisées sur des souris C57BL/6J, BALB/c, disposant d'un système immunitaire fonctionnel, ainsi que sur des souris immunodéprimées NSG, en veillant à respecter la règle des 3R et en limitant au maximum le nombre d'animaux utilisés, et en appliquant les points limites établis.

Pour chacune des combinaisons thérapeutiques (fonction de la lignée cellulaire et inhibiteurs en combinaison ou non avec les traitements standards) réalisées lors de nos expérimentations *in vivo*, nous utiliserons des groupes de 7 souris maximum, ce qui correspond à la taille d'échantillon minimum nécessaires à nos tests statistiques. De plus, nous étudierons plusieurs éléments sur un

même groupe de souris dès que cela est possible (réduction) et nous réaliserons seulement les expériences les plus indispensables sur les modèles murins. Enfin, dans le but de préserver le bien-être animal (raffinement) et pour anticiper l'arrivée des signes de souffrance liés à la maladie, nous suivrons l'évolution de la croissance tumorale en mesurant tous les 2 jours le volume des tumeurs, puis tous les jours lorsque la tumeur atteindra un volume égal ou supérieur à 1500 cm³. Nous avons prévu d'effectuer nos expérimentations sur 5 années et d'inclure 3207 souris dans nos protocoles expérimentaux.

15464 La coordination des cellules immunitaires est un élément essentiel dans la réponse aux agressions externes et internes. Des travaux menés au laboratoire depuis 5 ans ont établi que certains aspects de cette communication, bénéfiques dans le cadre de la lutte contre les pathogènes, pouvaient avoir un effet délétère en cancérologie. En parallèle nous avons pu valider que le blocage de ces voies de communications limitait la croissance des tumeurs chez la souris.

Pour aller plus loin, nous souhaiterions aujourd'hui affiner notre compréhension de ce mécanisme *in vivo*.

Pour cela nous utiliserons 2 souches de souris, des souris C57Bl6 déficientes pour le gène HPGDs et des souris C57Bl6 en contrôle. L'HPGDs est le gène responsable d'une communication intercellulaire néfaste en cancérologie. Les souris recevront des injections intrapéritonéales d'anticorps bloquant certaines voies de communication, puis des cellules tumorales, par injections intraveineuses de manière à induire des foyers tumoraux dans les poumons. Après 10 jours, les souris seront mises à mort pour évaluer le nombre de foyers tumoraux dans les poumons en fonction de la voie de communication qui aura été bloquée.

La mise en place de ce projet s'est attachée à respecter la règle des 3R. Tout d'abord, les expériences ne seront répétées que 2 fois et les rates, les ganglions et les tumeurs seront analysées sur les mêmes animaux ce qui permet donc de réduire le nombre d'animaux de l'étude. De plus, nous avons fait appel à un méthodologiste afin de déterminer au mieux le nombre minimal de souris requis pour que nos tests statistiques soient suffisamment puissants. Cette étude se base sur des résultats préliminaires obtenus sur des cultures de cellules *in vitro* (remplacement). Enfin, la totalité des procédures impliquant un inconfort potentiel des animaux (injections intraveineuses et mise à mort) sera réalisée sous anesthésie permettant ainsi le raffinement de l'étude. Cette étude nécessitera 120 souris C57Bl6 déficientes pour le gène HPGDs et 120 souris C57Bl6 en contrôle soit un total de 240 souris.

15465 Le système lymphatique a pour but de drainer des fluides tissulaires afin de les ramener à la circulation sanguine au niveau de la veine sous-clavière. Il est impliqué dans le transport des graisses et des macromolécules et joue un rôle important dans l'immunité en transportant les cellules de l'inflammation. Le réseau lymphatique est également impliqué dans de nombreuses pathologies telles que le lymphoedème, le psoriasis, la polyarthrite rhumatoïde, dans la dissémination métastatique et les pathologies cardiovasculaires.

Une dysfonction du système lymphatique entraîne chez l'homme, une pathologie nommée le lymphoedème, qui est le résultat d'une obstruction ou d'une perturbation du système lymphatique provoquant l'accumulation de fluides interstitiels dans un membre. Le lymphoedème est une pathologie douloureuse et handicapante, qui survient après la chirurgie du cancer, cependant aucune thérapie visant la régulation du dysfonctionnement de ce réseau lymphatique n'est proposée. Par ailleurs, le système lymphatique est altéré dans les pathologies cardiovasculaires telles que l'ischémie cardiaque, l'obésité ou le diabète. Dans ces contextes, la dysfonction lymphatique aggrave la pathologie existante, limitant les mécanismes de réparation tissulaire.

Le système lymphatique se différencie du système vasculaire sanguin par l'expression de marqueurs spécifiques. Ces marqueurs sont aujourd'hui utilisés pour cibler spécifiquement le système lymphatique *in vivo*. De plus, de récentes études mettent en évidence une spécialisation tissulaire des vaisseaux lymphatiques assurant ainsi une fonction adaptée selon les organes. Ce protocole a pour but d'étudier la fonction lymphatique de manière ciblée et tissu-spécifique dans des contextes physiologiques et pathologiques et nécessite donc le recours à l'animal. Le système

lymphatique est un système circulatoire, il draine l'excès de fluides des tissus, et facilite le transport des cellules immunes. Il est alors nécessaire d'étudier le système lymphatique dans un organisme vivant. Afin de respecter la règle des 3R (remplacer, raffiner, réduire), les études *in vitro* seront menés en amont.

En effet, l'identification de nouveaux gènes impliqués dans le système lymphatique sera préalablement réalisée *in vitro* sur la cellule endothéliale lymphatique ou proviendra de données d'analyse d'expression de gènes. L'étude de ces gènes se fera alors sur des lignées de souris transgéniques avec le fond génétique C57/BL6 afin d'éviter de trop forte variabilité génétique. Le nombre d'animaux pour notre étude est estimé à 290. Par ailleurs, les pratiques d'élevage des animaux dans les zootechnies assureront le bien-être des animaux tout au long de l'étude, notamment en assurant un suivi quotidien des animaux. Au moindre signe de souffrance des animaux (isolement, blessures, attitude anormale), le zootechnicien en avertira immédiatement le porteur de projet, et pourra procéder à son isolement si nécessaire ou à son sacrifice. Dans nos connaissances actuelles, nos procédures expérimentales ne doivent pas changer le comportement des animaux et leur bien-être. Nous assurerons un suivi des animaux au cours de la procédure expérimentale afin de réduire la douleur en utilisant des anesthésies, analgésiques et tapis chauffant. Par ailleurs, une grille de lecture avec une notation par score prenant en compte le comportement, l'alimentation, et l'état physiologique, est mise en place pour réduire la douleur des animaux si besoin ou décider d'euthanasier l'animal.

15466 Les maladies cardiovasculaires ischémiques et les accidents vasculaires cérébraux sont les principales causes de mortalité dans le monde, responsables de 15,2 millions de décès au total en 2016. Elles sont restées les premières causes de mortalité dans le monde au cours des 15 dernières années (Organisation Mondiale de la Santé, 2018). En France, 70 213 décès sont associés à une insuffisance cardiaque chaque année. 2,3 % de la population française serait atteinte d'une insuffisance cardiaque et jusqu'à 10 % chez les personnes âgées de 70 ans et plus (Santé publique France, 2019).

L'arythmie cardiaque est un problème du rythme de contraction des différentes structures du cœur, qui vont battre irrégulièrement et de manière désordonnée. Bien que certaines arythmies cardiaques soient bénignes et sans symptômes, d'autres peuvent être particulièrement graves et conduire à une baisse d'apport en oxygène aux organes (et notamment au cerveau) ou encore à une mort inattendue et soudaine, la mort subite. S'ils se développent aussi chez l'adulte sain, la majorité de ces troubles est associée à une maladie cardiaque sous-jacente. En France, il est estimé que près de la moitié des décès liés à l'insuffisance cardiaque sont dus à des arythmies ventriculaires graves conduisant à la mort subite (Fondation pour la Recherche Médicale, 2014). Les traitements pharmacologiques restent aujourd'hui peu nombreux (b-bloquant, inhibiteurs des canaux potassiques), et ont montré une efficacité limitée et, surtout, des effets secondaires graves, surtout pro-arythmiques. Si aujourd'hui le défibrillateur implantable reste l'unique thérapie efficace, son utilisation reste invasive (pose après ouverture de la veine jugulaire), extrêmement traumatisante pour le patient (décharge électrique à l'état éveillée, douleur) et limitée à certains centres hospitaliers.

Dans ce contexte, la mise en place d'un modèle d'arythmie ventriculaire *in vivo* reste une étape clé dans l'évaluation de l'efficacité de candidat médicament, les modèles *in vitro*/*in silico* n'ayant à ce jour pas encore été validés dans la littérature. Dans ce contexte, l'utilisation d'un modèle porcin se justifie par une similitude anatomique et physiologique avec l'Homme (fréquence cardiaque, hémodynamique, électrophysiologie). Ce projet s'intègre dans l'évaluation pharmacologique d'un candidat médicament. L'administration chez le porc constitue ainsi une étape essentielle dans le processus de sélection de candidat médicament. Le comportement de la molécule au sein d'un organisme proche de l'Homme est donc indispensable dans la prédictivité vers un protocole clinique (« REPLACE »). Cette étape intervient après avoir collecté des données de sélectivité, d'efficacité et de sécurité *in vitro*, *ex vivo*, et *in vivo*, chez d'autres espèces.

Dans notre laboratoire, nous avons mis au point un modèle d'arythmie ventriculaire chez le porc sain, anesthésié tout au long de l'étude et sans réveil consécutif. L'arythmie est induite

pharmacologiquement au cours d'une administration aiguë de caféine, reconnue pour induire cliniquement et expérimentalement des troubles du rythme. Avant l'expérimentation, l'animal sera anesthésié puis intubé et ventilé tout au long du protocole expérimental. Un traitement analgésique sera administré avant de débiter la phase chirurgicale pour potentialiser les effets anesthésiants. Avant l'expérimentation, les porcs sont hébergés en groupes dans des boxes enrichis de litière végétale dans laquelle leur aliment est dispersé afin de stimuler leur instinct de fouissage, ils bénéficient également de balles de jeux et d'éléments à mordiller (« REFINE »).

La mise en place de ce modèle a fait l'objet de deux autorisations de projet antérieures. Dans la première demande, nous avons d'une part validé la faisabilité de ce modèle en déterminant la voie d'administration de la caféine ainsi que sa dose optimale permettant de déclencher une/des arythmies ventriculaires de manière systématique, et ainsi envisager dans la demande suivante une standardisation et une validation de ce modèle, nous permettant par la suite de limiter le nombre d'animaux nécessaire pour des études pharmacologiques.

Dans le cadre de la seconde demande, nous avons poursuivi la démarche et avons commencé à valider ce modèle à l'aide de traitements de référence anti-arythmiques ainsi que de traitements spécifiques de nos cibles d'intérêt. En cours d'étude, nous avons été confrontés à un problème de reproductibilité de notre modèle.

Dans le cadre de cette troisième demande, nous souhaiterions consolider les effets observés lors des travaux précédents sur des effectifs plus importants et envisager d'évaluer l'effet de trois autres traitements de référence dans l'arythmie ventriculaire afin d'en déterminer le plus efficace dans notre modèle.

Dans un souci de raffinement, nous avons consulté l'équipe statistique afin d'évaluer la taille d'échantillon minimale nécessaire pour visualiser un effet statistique relevant. Ce projet prévoit un total de 60 animaux pour toute la durée de son autorisation (soit 3 années) avec l'intégralité de ses procédures classées sans réveil.

15467 En expérimentation animale, le bien-être des animaux favorise la collecte des données scientifiques de qualité. Ce bien-être peut être altéré dans certaines conditions expérimentales à cause des instruments de mesure et cela malgré la bonne intention de l'expérimentateur qui œuvre à réduire le stress des animaux et malgré son souhait d'avoir des données de qualité.

Ce projet est initié afin d'aider les scientifiques à pallier à cette situation dans certaines études expérimentales qui ciblent la mesure des paramètres cardiaques et respiratoires chez le rat. Ces derniers sont souvent utilisés pour détecter les effets (bénéfiques ou néfastes) d'une molécule dans le cadre du développement d'un médicament. Le projet consiste à évaluer la qualité des mesures physiologiques cardiaques et respiratoires générées par le port d'un gilet connecté chez le rat. Ce dispositif, de haute technologie, développé par nos chercheurs permet, pour la première fois, le suivi concomitant de ces deux fonctions, favorisant ainsi la mise en place de la règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer) qui constitue le fondement de la démarche éthique. Les rats, équipés du gilet connecté, seront sans contrainte et libres de leurs mouvements. Les mesures seront réalisées suite à une période d'habituation au gilet et dans leur environnement d'hébergement social. Les étapes de ce projet consisteront à prendre des mesures morphométriques (12 rats) afin de les équiper avec des gilets de taille adaptée à leur poids corporel et leurs mesures morphométriques et ensuite mesurer les paramètres cardiaques et respiratoires et comportementaux au port du gilet. Une bonne qualité de mesure nous permet de conclure sur la pertinence d'une utilisation plus large de ce gilet connecté et ainsi participer à l'amélioration du bien-être des animaux et la qualité de la recherche scientifique. Lors de ce projet, les rats seront soumis à de légères contraintes telles que la contention pendant une à deux minutes pour réaliser une tonte de deux flans où les électrodes ECG seront placées, une contention brève de moins d'une minute afin d'habiller le rat avec le gilet et une dernière contention d'une minute afin de brancher les câbles du gilet et des électrodes à l'émetteur placé dans un sac à dos sécurisé. Les rats seront mis en hébergement isolé pendant deux heures afin d'observer le comportement avec le gilet et réaliser

les mesures cardiorespiratoires. Suite à cela, les rats seront mis de nouveau dans leur cage d'hébergement social.

Afin de réduire l'angoisse et le stress induit par la contention et l'habillage, les rats seront habitués à l'expérimentateur qui les manipulera deux fois par semaine lors de la période d'acclimatation (une semaine avant). Le jour de l'habillage, les rats seront de nouveau manipulés dix minutes avant. Afin de limiter le stress induit par le changement d'environnement (mise en cage individuelle dans notre cas), nous utiliserons une partie de la litière issue de la cage d'hébergement social permettant aux rats de retrouver leurs odeurs dans la nouvelle cage d'enregistrement.

Conformité à la règle des 3 R (Remplacement, Raffinement, Réduction) :

S'agissant d'une étude qui nécessite une observation comportementale et la mesure et le suivi des paramètres physiologiques tels que la fréquence cardiaque et respiratoire, il nous est impossible d'utiliser des méthodes *in vitro* et il est nécessaire de recourir à une expérimentation sur animal vigile.

Le nombre d'animaux nécessaire à cette étude a toutefois été calculé au plus juste (12 rats, dont 8 rats mâles et 4 rats femelles) afin de collecter les informations pertinentes sur la taille de gilet adapté pour des rats qui pèsent entre 300 et 400 grammes et déterminer si la qualité de pelage entre les deux sexes (pelage plus doux chez les femelles) a un impact sur la bonne tenue du gilet.

L'utilisation de gilets connectés Decro permet de réaliser de façon totalement non invasive et non contraignante pour l'animal l'enregistrement de l'électrocardiogramme, l'étude de la respiration et de l'activité locomotrice spontanée chez le rat vigile et libre de ses mouvements (« Raffinement » des procédures).

Les manipulations ainsi que la courte durée d'isolement ne sont pas délabrantes et n'ont pas de conséquences attendues néfastes pour l'animal. Les animaux pourront donc être proposés pour réutilisation à l'issue dudit protocole (objectif de "Réduction").

Les conditions d'hébergement choisies sont adaptées aux besoins des rats physiologiques et comportementaux (température, enrichissement du milieu de vie, hébergement en cages collectives,).

15468 Le diabète de type 2 (DT2) (dont 425 millions de sujets sont atteints dans le monde) est une maladie complexe caractérisée par une glycémie élevée due à un défaut de de l'insuline produite par le pancréas et une altération de son action sur ses tissus cibles (muscle, graisse, foie). En l'absence de traitement approprié, le diabète peut conduire à des complications sévères. Malgré l'existence de plusieurs traitements, des progrès sont encore à réaliser dans le domaine de la prévention et de la prise en charge du DT2. L'identification de nouvelles molécules thérapeutiques avec un mécanisme d'action original présente donc un intérêt majeur pour cette pathologie et répondrait à une attente médicale forte.

Nos travaux ont permis de valider un nouveau mécanisme impliqué dans le diabète pouvant cibler à la fois le pancréas et le muscle. Dans ce projet, nous avons donc sélectionné des nouvelles molécules de structures chimiques originales, qui sont actives *in vitro* sur le pancréas et le muscle. Afin de déterminer leur efficacité dans l'organisme entier, nous projetons une étude chez des rats obèses qui présentent un prédiabète. Ces rats possèdent une modification génétique spontanée, qui n'entraîne pas chez eux de signes de souffrance ou d'angoisse au stade étudié. Le métabolisme des animaux sera étudié grâce à des explorations fonctionnelles *in vivo* non invasives (prise de sang et injection de glucose). Ces travaux permettront de valider l'efficacité de nos deux nouveaux composés comme nouveau traitement antidiabétique. Pour la réalisation de ce projet, 70 rats seront utilisés dans des procédures d'explorations fonctionnelles sur une période de 2 ans.

Le projet proposé prend en compte la législation en vigueur en appliquant la règle des 3R (Réduction, Remplacement, Raffinement) de la manière suivante

Réduction Le nombre de 10 animaux par groupe estimé pour ce projet a été réduit au minimum pour valider les résultats avec des tests statistiques. Notre laboratoire ayant une forte expertise en expérimentation animale, ce nombre a été défini à partir de données de la littérature mais aussi

d'expériences similaires à celles proposées dans ce projet précédemment réalisées au laboratoire. En effet, nous avons pu constater que le modèle étudié présente une certaine variabilité inter-individus anomalies métaboliques. De plus, nous n'avons retenu que les 2 meilleures (sur 47 testées) molécules suite aux tests préalables *in vitro* pour l'expérience *in vivo*.

Remplacement L'utilisation d'un modèle rongeur est nécessaire pour se rapprocher au plus près de la maladie humaine. Les modèles *in vitro* réalisés sur cellules isolées ne permettent pas d'évaluer un effet global sur l'équilibre métabolique d'un organisme entier.

Raffinement Afin d'assurer leur bien-être, les animaux seront placés dans des conditions optimales (température, hygrométrie, cycle jour nuit 12h/12h, enrichissement des cages) au sein d'une animalerie agréée. Les procédures expérimentales décrites dans ce projet sont non invasives, standardisées et validées par la communauté scientifique travaillant dans le domaine du métabolisme, ce qui permet une meilleure comparaison des résultats avec ceux décrits dans la littérature. Le bien-être de l'animal ne sera pas affecté par ces procédures mais fera l'objet d'une surveillance.

15469 L'obésité est un problème majeur de santé publique associée à de nombreux désordres métaboliques tels que la résistance à l'insuline, la stéatose hépatique (NAFLD) et la stéatohépatite non alcoolique (NASH). Chez un sujet mince, au cours de la transition jeûne/renourri, les cellules du foie (hépatocytes), s'adapte aux changements nutritionnels en modifiant l'expression de plusieurs gènes. Lors de l'obésité, cette modification d'expression de gène est altérée, conduisant à une perturbation de l'adaptation du métabolisme hépatique. Notre laboratoire a identifié une protéine dont l'expression varie entre l'état de jeûne et l'état renourri, et dont la suppression réalisées dans la lignée d'hépatocyte HepG2 *in vitro* altère la production de glucose par le foie. L'ensemble de ces résultats suggèrent que la variation d'expression de cette protéine de l'endocytose lors de la transition jeûne/renourri participe à l'adaptation des hépatocytes aux changements nutritionnels. De manière intéressante, l'étude des bases de données d'ARN messenger purifiés à partir de foie de patients sains, NAFLD et NASH nous a permis de mettre en évidence une diminution de l'expression de cette protéine dans le foie, ce qui pourrait participer à la pathogenèse de la NAFLD et de la NASH. Nous voulons donc déterminer l'impact de la suppression de cette protéine de l'endocytose dans les hépatocytes sur le développement de l'obésité et des complications métaboliques chez la souris. Aucune étude publiée à ce jour n'a exploré le rôle de cette protéine dans ce contexte. Pour cela, nous devons démontrer que les résultats obtenus *in vitro* dans la lignée cancéreuse d'hépatocyte HepG2 sont retrouvés dans des hépatocytes isolés directement du foie (hépatocytes primaires), plus proche de la réalité physiologique. Nous isolerons ces hépatocytes primaires à partir de foie de souris contrôle ou invalidées pour cette protéine spécifiquement dans les hépatocytes. Si ces travaux confirment le rôle clef de cette protéine dans les hépatocytes primaires, nous chercherons ensuite à déterminer l'impact de la suppression de cette protéine sur l'adaptation à la transition jeûne/renourri en condition physiologique (régime normal) puis pathologique (régime riche en graisse). Cela ne peut se faire que sur un organisme entier, car la régulation des niveaux sanguin de glucose et de lipides lors de cette transition fait intervenir plusieurs organes (foie, muscle, tissu adipeux, intestin). Pour cela, les souris contrôle ou invalidées pour cette protéine spécifiquement dans les hépatocytes seront étudiées en régime normal à l'état nourri, à jeun, ou à jeun puis renourri avec un régime riche en glucide. Si ces résultats confirment le rôle clef de cette protéine de l'endocytose dans la régulation de l'adaptation à la transition jeûne/renourri, nous étudierons l'impact de sa suppression sur le métabolisme du glucose et des lipides lors d'un régime riche en graisse, mimant l'obésité. Ce travail nous permettra de déterminer si la perte d'expression de cette protéine de l'endocytose dans les hépatocytes contribue à l'obésité et/ou aux complications métaboliques hépatiques. Au final ce projet présentera un rapport avantages/dommages positif puisqu'il doit contribuer à améliorer nos connaissances des mécanismes moléculaires impliqués dans le développement des pathologies associées à l'obésité chez l'homme en utilisant (i) un modèle établi de souris (fond génétique C57Bl6) qui ne présente pas de phénotype dommageable, (ii) des procédures expérimentales qui n'affectent que faiblement les conditions de vie de l'animal, et (iii) une stratégie par étape successive

de validation qui limitera l'utilisation d'animaux si les effets biologiques sont différents de ceux attendus. La règle des 3Rs est donc prise en compte ici de la façon suivante. Pour satisfaire à la réduction, la procédure prévoit d'utiliser le nombre minimum d'animaux nécessaires à des études statistiques pertinentes à savoir 804 souris. Pour le raffinement, l'hébergement sera réalisé dans des locaux appropriés et les personnes réalisant les procédures sont autorisées et appliqueront les règles d'éthiques. L'environnement sera enrichi pour diminuer le stress. Le suivi sanitaire régulier permettra d'identifier, le plus rapidement possible, les souris souffrantes et de prendre les mesures nécessaires. Enfin pour satisfaire au remplacement, et comme expliqué ci-dessus, notre hypothèse a tout d'abord été validée sur une lignée cellulaire établie. Il nous faut maintenant l'étudier dans un contexte plus physiologique, or il n'existe pour l'instant pas de modèle *in vitro* qui pourrait remplacer l'expérimentation sur un organisme entier.

15470 Les longs ARNs non-codants (lncARN) pourraient représenter un élément manquant dans notre compréhension des altérations favorisant le développement tumoral. En effet, ces molécules sont d'importants régulateurs de l'expression des gènes par divers mécanismes impliquant notamment des associations avec des protéines. De récents travaux ont montré que les lncARNs régulent la prolifération des cellules, leur mort et/ou leur pouvoir invasif responsable notamment des métastases cancéreuses. Leur implication dans la physiopathologie du cancer est fortement suspectée mais encore peu documentée. En effet, leur expression est dérégulée dans divers cancers, mais il y a moins de 1% de ces transcrits dont on connaît la structure et la fonction.

Dans ce contexte, nous nous intéressons au rôle des lncARNs dans le développement des cancers pulmonaires (CBNPC) et plus particulièrement à des lncARNs sensibles à l'environnement tumoral appauvri en oxygène. En effet, au cours de la croissance rapide des tumeurs, des cellules cancéreuses se trouvent éloignées des vaisseaux sanguins et ont un manque d'apport en oxygène appelé "hypoxie". L'hypoxie est un important facteur favorisant l'agressivité des cellules tumorales en changeant notamment leurs capacités invasives et leur résistance aux traitements. Nous avons identifié et caractérisé des lncARNs dont l'expression dans ces cancers est altérée par l'hypoxie et est associée à une diminution de la survie des patients. *In vitro*, nous avons montré que l'inhibition de l'expression de certains de ces lncARNs dans des lignées tumorales pulmonaires affecte des processus cellulaires comme la prolifération, la survie ou la migration suggérant que ces transcrits pourraient jouer un rôle dans le développement tumoral. Par ailleurs, des cribles fonctionnels *in vitro* sont en cours de réalisation afin de déterminer l'impact de l'inactivation d'une trentaine de lncARNs sur la réponse cellulaire à l'hypoxie et sur la sensibilité au cisplatine, traitement chimiothérapeutique de première intention des cancers pulmonaires.

Nos objectifs sont de déterminer les effets de l'inhibition ou de l'augmentation de l'expression d'un maximum de 5 lncARNs candidats sur la croissance tumorale et sur la sensibilité au cisplatine *in vivo*. Dans cette optique, nous utiliserons des modèles de croissance tumorale chez la souris, pour leur similitude avec les processus cancéreux chez l'homme.

Dans un souci de réduction, les hypothèses qui sous-tendent ce projet seront préalablement validées sur des modèles cellulaires *in vitro*. Cela permettra notamment de sélectionner, en fonction des effets de leur inactivation sur la croissance, l'invasion, la survie cellulaires ou la sensibilité au cisplatine, les 5 meilleurs lncARNs candidats sur lesquels nous mènerons ces études *in vivo*. Le nombre d'animaux utilisés, sera le plus restreint possible tout en permettant la validation statistique d'effets significatifs. Il sera réduit chaque fois que possible, et toute expérience rendue inutile au cours de l'avancement de nos travaux ne sera pas réalisée. De plus, les mêmes animaux seront utilisés pour les études de croissance tumorale et pour la réalisation des analyses histologiques et moléculaires à posteriori. Ce projet utilisera au maximum 1860 souris adultes soit 372 souris par lncARN candidat étudié.

Dans un souci de raffinement, les animaux seront observés 3 fois par semaine et des points limites précoces appropriés seront fixés afin de prendre en charge tout signe de douleur, de stress ou d'inconfort et afin de limiter autant que possible la souffrance potentielle des animaux. Tous les intervenants seront titulaires d'une formation à l'expérimentation animale.

Dans un souci de remplacement, seuls les lncARNs candidats préalablement validés dans des modèles *in vitro* seront étudiés. Par ailleurs, nous mettons en place des systèmes de culture 3D de cellules tumorales seules ou en combinaison avec des cellules du stroma tumoral afin de caractériser par la suite les mécanismes moléculaires contrôlés par les lncARNs candidats pour lesquels nous aurons mis en évidence un rôle dans le développement tumoral *in vivo*.

15471 Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) regroupe la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique. Elle se caractérise par une inflammation du tube digestif et du rectum pour la rectocolite hémorragique alors que la maladie de Crohn peut atteindre la totalité du tube digestif. Ces pathologies touchent environ 250 000 personnes en France et 3 000 000 dans le monde. Les MICI sont associées à une augmentation du risque d'accidents thromboemboliques veineux et artériels. Le projet cible le nouveau concept d'immunothrombose (IT), initialement défini comme un système de défense contre l'entrée d'agents pathogènes dans la circulation, car lorsqu'il est hyperactivé (IT dérégulée) il pourrait conduire à un état prothrombotique et in fine à un développement de la fibrose intestinale qui sont deux complications majeures des MICI. Les traitements actuels des MICI par des anti-inflammatoires agissent sur l'inflammation mais pas sur le versant « thrombotique » et donc pas sur l'IT. De nouvelles molécules pour normaliser l'IT dérégulée seraient complémentaires (ou alternatives) des traitements anti-inflammatoires. Nous nous intéresserons au rôle de la paroi vasculaire dans la survenue des événements thromboemboliques et l'inflammation intestinale des MICI.

Dans le cadre du respect de la règle des 3R Remplacement Il n'existe pas d'alternative *in vitro* pour étudier les mécanismes des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et induire des colites. Réduction Afin de limiter le nombre d'animaux, plusieurs types de mesures seront effectuées sur un même animal. Raffinement Toutes les expériences invasives se feront sous anesthésie gazeuse (isoflurane en traitant la douleur si nécessaire par injection sous-cutané de buprénorphine). Il y aura 4 groupes, animaux contrôles et animaux mutés chacun subdivisé en deux groupes sans ou avec colite aigue. Ainsi 164 souris seront nécessaires pour cette étude afin d'obtenir une puissance statistique suffisante tout en réduisant au maximum le nombre d'animaux. Raffinement toutes les procédures expérimentales auront lieu dans une pièce où les souris ne sont pas hébergées, dans un environnement sécurisant pour l'animal et les endoscopies se feront sous anesthésie générale. Une procédure d'estimation et suppression de la douleur est mise en place. Les points limites sont fixés selon un score défini au préalable et qui tient compte des signes éventuels de mal-être (isolement, yeux fermés, dos voûté, poils hérissés, immobilité, perte de poids, déshydratation, automutilation).

Au total, il y aura 5 procédures incluant l'induction de la colite, une endoscopie pour évaluer la gravité du phénotype, une échographie vasculaire, un temps de saignement à la queue et un modèle de thrombose au chlorure de fer pour évaluer le risque de thrombose. Enfin la dernière procédure consistera en un prélèvement sanguin pour les études *in vitro*. Ces procédures seront effectuées sur nos 4 groupes de souris

C57BL/6 vSMKO +/-

C57BL/6 vSMKO +/- avec colite aigue DSS 3%

C57BL/6 vSMKO -/- contrôle

C57BL/6 vSMKO -/- avec colite aigue DSS 3%

En fin de protocole, les animaux seront mis à mort et des organes prélevés pour permettre des analyses histologiques et biochimiques.

15472 La résistance à l'insuline est centrale au pré-diabète de type 2 et elle est considérée comme un élément majeur du risque de transformation d'une obésité morbide en diabète. Récemment, nous avons montré chez le porc puis chez l'homme que la résistance à l'insuline se traduisait au niveau cérébral par une augmentation de la consommation de glucose alors que cette dernière est diminuée à la périphérie. Cette mesure a été réalisée au cours d'une perfusion continue d'insuline mimant l'augmentation de la sécrétion de cette hormone après le repas. Pour autant, cet artifice

expérimental ne décrit qu'imparfaitement la réalité où l'insuline est sécrétée de manière pulsatile et non continue. L'objectif du programme est d'évaluer les différences de métabolisme du glucose à la suite d'administration pulsatile ou continue d'insuline chez l'animal normopondéral puis obèse. Ces mesures seront effectuées au moyen de l'imagerie nucléaire pour suivre le décours d'une substance radioactive se comportant comme glucose. L'ensemble de l'expérience tend à l'optimisation dans le cadre de la règle des trois R. Dans le cadre du volet remplacement, l'expérience est optimisée *in silico* avant sa réalisation pratique par l'utilisation d'un modèle mathématique conçu à partir des données de nos travaux précédents. Dans le cadre de la réduction du nombre d'animaux, l'analyse des données sera basée tant sur les données issues de l'expérience proposée que sur des données obtenues précédemment sur des animaux rigoureusement identiques et avec des méthodes similaires. Cette stratégie nous permettra de réduire de moitié le nombre d'animaux nécessaire. Dans le cadre du raffinement des méthodes et également de la réduction de la douleur, les mesures sont réalisées à l'aide de l'imagerie nucléaire, une méthode minimalement invasive considérée comme la méthode de référence pour la quantification de la captation du glucose cérébral. Les stratégies connexes nécessaires pour la quantification sont toutes réalisées extemporanément sous anesthésie et le délabrement tissulaire est absent pour la pose (et le retrait) des cathéters vasculaires par l'utilisation du guidage échographique. Le nombre total d'animaux utilisés pour l'expérience est de 10 sujets.

15473 Le bisphénol A (BPA), reconnu comme perturbateur endocrinien, est un plastifiant utilisé afin de produire des contenants alimentaires dans l'industrie agro-alimentaire, et a des effets délétères sur la fonction reproductive (hypothalamus et gonades) des mâles et des femelles, ayant entraîné l'interdiction de son utilisation en France dans l'industrie agro-alimentaire. C'est pourquoi de nouveaux analogues du BPA, dont le bisphenol S (BPS), ont émergé afin de remplacer le BPA. Il est donc important d'étudier les effets du BPS chez l'humain, notamment avant que l'exposition environnementale du BPS augmente, les premières données obtenues suggérant que les 2 molécules (BPA et BPS) ont des effets similaires. Etant donné qu'il est difficile de réaliser une étude chez l'humain, le modèle brebis a été retenu. En effet ce modèle animal présente une plus grande proximité physiologique avec l'espèce humaine en terme de reproduction (durée du cycle oestral, durée de gestation, nombre d'ovulation) par rapport aux modèles rongeurs classiquement utilisés. Les cellules de rongeurs sont par ailleurs plus résistantes aux bisphénols (de 10 à 100 fois) par rapport aux cellules humaines. Ce projet vise à étudier comment le bisphénol S peut affecter le développement de l'ovaire ou du testicule du nouveau né après une exposition au cours de la gestation. Ce projet consistera à exposer 2 lots de brebis en gestation, l'un recevant du bisphénol S et l'autre pas (0 ou 50 µg/kg/jour), entre le 2^e et le 5^e mois de gestation (soit pendant 3 mois), via leur alimentation. Après mise bas, afin de mesurer l'impact de l'exposition au bisphénol S sur le développement gonadique, on procède, sur les agnelles, à des prises de sang et des mesures par IRM de la population folliculaire des ovaires et sur les agneaux, à des mesures de poids testiculaires et à des bilans hormonaux. Des suivis de poids et de note d'état corporel permettront d'apprécier l'impact du bisphénol S sur le métabolisme des individus (en effet le bisphénol A a été décrit pour ses propriétés obesogènes).

Ce projet respecte la règle des 3R :

Remplacement pour comprendre les effets d'une exposition prolongée au bisphénol S chez l'humain, le recours à une espèce animale est nécessaire. Le modèle ovin a été retenu, car il ne présente pas de résistance naturelle à ce composé, contrairement au modèle rongeurs.

Raffinement les brebis utilisées dans ce projet (2 groupes de 25 brebis) seront placées sous surveillance quotidienne (activité, comportement) et hébergées dans une bergerie avec aire paillée intégrale, facilité d'accès à la nourriture et à l'eau et répondant aux normes d'élevage chez cette espèce. Les animaux seront maintenus en groupes sociaux stables. Les déplacements se feront dans le calme. Les mises à jeun avant IRM seront limitées à 24H avec accès à l'eau jusqu'à la veille au soir de l'intervention. Les IRM seront réalisées après anesthésie des animaux.

Réduction le protocole expérimental permet de réduire au maximum le nombre d'agnelles grâce à l'utilisation de l'IRM qui permet de suivre les mêmes individus pour les différentes mesures

effectuées. Deux lots de 25 brebis gestantes (1 traité, 1 témoin, prolificité de 1,6 agneau/mère) avec 2 lots de 20 agnelles et 20 agneaux issus de ces mères soit 80 jeunes et donc un total de 130 animaux (50 mères et 80 jeunes) sont nécessaires pour évaluer les effets de l'exposition au bisphénol S sur le développement ovarien et testiculaire.

15474 Le cancer du pancréas fait partie des cinq cancers les plus meurtriers avec un taux de survie à 5 ans très faible (8.2%) et une survie de seulement 6 mois. Surnois et difficilement détecté, les patients diagnostiqués ont déjà des atteintes sur des vaisseaux avoisinants ou des organes distants, les 20% restants peuvent recourir à la chirurgie. Les résultats des chimiothérapies demeurent décevants, de nouveaux traitements et de nouvelles techniques de diagnostic doivent être urgemment développés afin de limiter/éradiquer ce cancer.

Ce projet est centré sur l'adressage sélectif d'agents d'imagerie vers l'adénocarcinome pancréatique (AP) afin d'améliorer le diagnostic de ces tumeurs extrêmement agressives, quasi-incurables, représentant 80% des tumeurs du pancréas. Cet adressage sélectif se fait par l'intermédiaire du récepteur aux lipoprotéines de faible densité (LDL), le LDLR, qui est abondamment présent à la surface des cellules tumorales pancréatiques. A cet effet, des vecteurs (peptides) reconnaissant spécifiquement sa partie extra-cellulaire, conjugués à des agents d'imagerie (fluorochrome, isotope) ont été développés et optimisés par nos collaborateurs possédant une expertise reconnue dans ce domaine (4 brevets). L'objectif de cette étude est de démontrer l'intérêt d'utiliser ces outils en clinique afin d'améliorer le diagnostic en essayant de déceler par imagerie médicale les métastases sans avoir recours à un acte chirurgical à visée exploratoire et d'autre part, de discriminer une pancréatite (aigüe ou chronique) d'un AP.

Cette étude sera réalisée sur 1/ un modèle de greffes syngéniques de cellules tumorales pancréatiques dans la rate (i.e. intra-splénique) qui permet le développement de métastases pancréatiques dans le foie et 2/ des souris traitées pendant une courte ou une longue durée avec de la céruléine afin d'induire des pancréatites aiguës ou chroniques. Ces deux modèles reproduisent fidèlement ces pathologies humaines. Deux études sur des explants de tumeurs induites ou spontanées seront également réalisées. Le nombre d'animaux par groupe expérimental a été réduit au minimum requis pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs. Il a été défini avec un risque alpha de 0.05, une puissance de test égale à 0.8. Le nombre total de souris pour cette étude s'élève à 53 souris KI/KIC et 10 souris athymiques. Un enrichissement matériel (twists, cocon ou nid) de l'environnement des animaux est mis en place dans toutes les cages afin qu'ils expriment un répertoire diversifié de comportements normaux. De plus, une observation quotidienne des animaux porteurs de tumeur pancréatique ou de métastases pancréatiques dans le foie ou atteints de pancréatite aiguë ou chronique permettra d'établir quotidiennement un score prenant en considération la perte de poids, la présence de signes de douleur ou de souffrance notable (cardiaque, respiratoire). Afin d'atténuer toute forme de souffrance des animaux, des injections d'analgésique (pour les blessures liées aux bagarres) ainsi que des anesthésies gazeuses (pour les expérimentations) seront réalisées. Lorsque le point limite, tel que défini dans la grille de score sera atteint, l'expérience prendra fin. Toutes ces actions sont mises en place afin de respecter la règle des 3Rs, à savoir 1/ le remplacement, toutes les procédures proposées ont été réfléchies dans le but de remplacer, quand c'est possible, les modèles *in vivo* par des modèles *in vitro*, 2/ la réduction, le nombre d'animaux proposé a été calculé selon une procédure statistique permettant de calculer le nombre minimum d'animaux nécessaires à l'obtention d'un effet biologique robuste et significatif et 3/ le raffinement, les expérimentations ont été réfléchies dans le but de réduire au maximum la souffrance des animaux notamment via des points de limite bien définis. Enfin, les animaux seront hébergés dans des cages par groupe de 5 afin qu'ils conservent des interactions sociales.

15475 Face aux enjeux économiques, environnementaux et sociétaux que doit relever l'élevage laitier, le pilotage de l'alimentation est une des clés majeures d'adaptation du système. L'alimentation des vaches laitières est caractérisée par une part très importante de fourrages, notamment pâturés, plus ou moins combinés entre eux. En particulier, lorsque la ressource en herbe ne permet pas de couvrir

les besoins des animaux, des fourrages conservés et des concentrés peuvent être distribués en complément. Les conséquences de ces associations de fourrages, avec ou sans concentrés, sur la valorisation de l'azote par les animaux, leurs performances et l'excrétion d'azote, à l'origine de rejets vers l'environnement (e.g. émissions d'ammoniac), sont encore peu connues. L'objectif de ce projet est donc d'analyser les déterminants de l'efficacité et de l'excrétion d'azote sur régimes mixtes associant herbe verte et ensilage de maïs selon différentes proportions, en système bovin lait.

Pour approfondir cette question, un essai sera conduit pour suivre les variations de flux d'azote à l'échelle de la vache laitière lorsque celle-ci est nourrie avec des rations associant herbe fraîche et ensilage de maïs selon des proportions variables (0 à 60% d'ensilage, donc 40 à 100% d'herbe). Il sera réalisé à l'auge afin de pouvoir mesurer précisément les flux d'azote (ingéré et excrété) à l'échelle individuelle et de la journée. Durant cet essai, nous allons mesurer ou estimer les différents flux de matières, et principalement d'azote et d'urée, à l'échelle de l'animal.

Cet essai respectera la règle des 3R

Remplacer Il n'est pas possible de remplacer l'utilisation d'animaux pour étudier les flux d'azote à l'échelle de l'animal, incluant des mécanismes de recyclage/mobilisation notamment au sein du rumen et par la salive.

Réduire Le schéma expérimental en carré latin ainsi que l'analyse statistique des données permettront de répondre aux objectifs scientifiques tout en limitant le nombre d'animaux à 8 dans ce projet. Raffiner La conduite d'élevage sera conforme aux règles d'élevage en vigueur. Un suivi régulier du comportement des animaux sera mis en place pour détecter le plus rapidement possible tout signe de souffrance ou de douleur. Les régimes testés, classiques, n'induisent a priori aucune douleur ou souffrance. Des points limites adaptés ont été définis afin d'éviter au maximum toute forme de souffrance des animaux.

15476 La présente étude est importante pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement des troubles affectant le cerveau dans la myopathie de Duchenne (DMD). Notre modèle d'étude est une souris transgénique porteuse d'une mutation dans le gène responsable de cette maladie, fréquente chez les patients et associée à des déficits cognitifs sévères et des troubles neuropsychiatriques. La sévérité des atteintes cérébrales est variable selon la position de la mutation et nous disposons aussi d'autres souris modèles permettant de comparer les déficits et l'efficacité des traitements en fonction de la mutation. Nous testerons l'efficacité de deux approches de thérapie génique qui ont pour effet de supprimer la mutation, donc de corriger le gène défectueux. Plusieurs molécules prometteuses seront évaluées dans ce projet nous comparerons leur efficacité suite à des injections intracérébrales ou intraveineuses sous anesthésie profonde, les injections intraveineuses ayant pour but de faire circuler le traitement dans tout l'organisme pour traiter à la fois les muscles et le cerveau. Nous utiliserons divers tests comportementaux pour identifier les déficits et leur sévérité en fonction de la mutation chez différentes souris modèles, puis pour évaluer l'efficacité de nos approches thérapeutiques. Des analyses moléculaires post mortem compléteront l'étude. L'exécution du projet se fera en accord avec la règle des 3R. Remplacement L'objectif étant d'évaluer des effets thérapeutiques sur le comportement et les capacités cognitives, les approches *in vivo* sont incontournables, et la souris est l'espèce dans laquelle des mutations comparables à celles des patients peuvent être étudiées. Réduction Nous utiliserons un nombre total maximal de 3888 souris sur 5 ans, nécessaires la production des animaux expérimentaux, la constitution des différents groupes traités et des groupes contrôles comprenant chacun en moyenne 15 souris afin de conclure à partir de données statistiques fiables. Ce nombre inclue également les femelles et reproducteurs utilisés pour la production des souris. La première partie du projet permettra de réduire le nombre de tests à une sélection suffisante pour évaluer ensuite les effets de traitements. Raffinement Nos études précédentes ont permis de sélectionner des molécules dénuées de toxicité et des doses thérapeutiques transposables à l'Homme. Les méthodes chirurgicales ont été validées et optimisées pour réduire au maximum la souffrance et l'inconfort, via l'utilisation d'anesthésies profondes, d'analgésiques avant, pendant et après chirurgie, l'enrichissement de l'environnement d'élevage et le maintien d'activités sociales. L'état de santé et de confort postopératoire des souris sera surveillé et quantifié à l'aide d'une grille d'évaluation, en

concertation avec le vétérinaire et la cellule bien-être animal de notre institut et les points limites seront respectés. L'étude se déroulera donc dans des conditions respectueuses de l'animal minimisant angoisse et souffrance elle apportera de nouvelles pistes de médecine personnalisée pour la DMD en comparant des souris porteuses de mutations différentes modélisant les différents sous-groupes de patients.

15477 Le sommeil est un processus complexe impliquant de nombreuses régions dans le cerveau. De plus, le sommeil paradoxal (SP) a largement été sous-étudié et ses fonctions sont aujourd'hui encore mal connues. Les techniques standards d'enregistrement de l'activité cérébrale pour l'étude du sommeil sont l'IRM fonctionnelle chez l'homme et les primates non-humains d'une part, et les enregistrements électrophysiologiques dans les modèles rongeurs, d'autre part. Ces deux techniques présentent des inconvénients l'IRM fonctionnelle est coûteuse, peu adaptée à l'étude du sommeil et n'offre pas une résolution temporelle suffisante, tandis que l'électrophysiologie souffre d'une faible résolution spatiale et ne permet pas l'étude simultanée de plusieurs régions du cerveau.

L'imagerie ultrasonore fonctionnelle permet de mesurer les variations de flux sanguin cérébral dans plusieurs régions du cerveau simultanément, avec une bonne résolution spatiotemporelle. Elle est compatible avec l'étude du sommeil car portable et adaptée à l'échelle des rongeurs. Une récente étude utilisant cette technique a mis en évidence l'existence d'une augmentation de l'afflux sanguin cérébral pendant le SP. Cette élévation du volume sanguin cérébral se fait à des niveaux bien supérieurs à ceux de l'éveil et présente des patrons d'activation qui varient d'une région cérébrale à une autre. Une telle augmentation du volume sanguin cérébral est énergivore et pourtant, son maintien dans une espèce mammifère suggère un rôle primordial qu'il a fallu préserver au cours de l'évolution.

Ce projet s'inscrit dans une volonté de comprendre les fonctions de ce phénomène particulier du sommeil paradoxal en étudiant un nombre plus important de régions cérébrales, afin de caractériser précisément leur activité vasculaire.

De plus, au cours de cette étude, les enregistrements ont montré une augmentation de la quantité de sommeil paradoxal, comparé à des valeurs classiques relevées dans la littérature. Notre hypothèse est que l'imagerie ultrasonore fonctionnelle pourrait augmenter la proportion de sommeil paradoxal.

Ces études étant à termes utiles à l'Homme, notamment dans l'étude des pathologies ayant un impact sur le sommeil et vice versa (maladie d'Alzheimer par exemple), il est nécessaire de remplacer le modèle humain par des modèles de mammifères suffisamment proches de l'homme, sans pour autant utiliser des espèces sensibles comme les primates non humains par exemple.

De plus, dans un souci de réduction, nous avons pensé notre projet de sorte à minimiser le nombre d'animaux utilisés et si possible les réutiliser d'une procédure à l'autre. De plus, nous avons amélioré notre procédure chirurgicale, pour assurer un meilleur taux de succès.

Enfin, dans une volonté de raffinement, nous veillerons en continu au bien-être des animaux par l'ajout d'enrichissement dans leur cage d'hébergement, l'interaction quotidienne avec l'expérimentateur et l'utilisation d'analgésie et d'anesthésie lors de la procédure chirurgicale et au besoin en soins post-opératoires. Ce projet nécessitera un maximum de 60 rats adultes (50 mâles et 10 femelles) sur 5 ans.

15478 Notre projet s'intéresse aux nouvelles technologies et techniques chirurgicales d'assistance (tissulaire et/ou mécanique) et de réparation de l'insuffisance cardiaque post-infarctus. Il s'agit d'un axe de recherche et de développement très actuel et en phase avec un besoin important à la fois en compréhension fondamentale et en application clinique humaine.

Notre équipe souhaite explorer une piste peu connue du domaine des assistances cardiaques nommée Compression Cardiaque Directe (Direct Cardiac Compression en anglais ou DCC). Le concept des DCC consiste à appliquer un effort sur la paroi externe du cœur grâce à un

exosquelette afin d'améliorer l'éjection du sang par ce dernier et ainsi de restaurer le débit cardiaque.

La première étape, et l'objet de cette saisine, est le test d'une bio-membrane interface nécessaire entre le cœur et l'exosquelette.

Des études préliminaires ont montré la biocompatibilité des constituants de cette membrane mais il est indispensable maintenant de passer à l'étape de validation chez l'animal en situation physiologie (remplacement).

38 rats mâles wistar seront répartis en 2 groupes 1 groupe de rats témoins + un groupe de rats avec infarctus (par ligature de l'artère coronaire). La bio-membrane sera greffée chez tous les animaux. Un contrôle de la fonction cardiaque sera réalisé au moyen d'une imagerie TEP. Ces opérations seront réalisées sous anesthésie générale. A la fin des procédures, une overdose d'anesthésiant entraînera la mort de l'animal sans souffrance avant de réaliser des prélèvements d'organes en vue d'analyses histologiques.

Nous avons établi des points limites (modification des paramètres cardiaques et respiratoires indiquant un réveil, une douleur ou un inconfort de l'animal durant l'opération chirurgicale mais aussi comportement inadéquat, modifications physiques pendant toute l'étude) qui ne seront pas dépassés grâce aux procédures médicamenteuses disponibles au laboratoire (analgésie, anesthésie chirurgicale) ou à une prise en charge suffisamment précoce.

Ce modèle est déjà en place dans notre structure permettant de réduire le nombre d'animaux. Ainsi, 38 rats sont nécessaires permettant ainsi une étude statistiquement exploitable.

Les conditions d'hébergement (enrichissement du milieu), de soins (établissement de points limites) et surtout les méthodes utilisées (opérations sous anesthésie générale, analgésie contrôlée) qui sont des méthodes dérivées directement de la pratique clinique chez l'homme permettent ainsi un raffinement de la méthodologie.

15479 La maladie d'Alzheimer est une maladie évolutive représentant la forme la plus connue de démence. Elle se caractérise par des pertes de mémoire, une diminution des capacités intellectuelles et la perte progressive de réponses adaptées à la vie quotidienne. En France, plus de 225 000 cas de maladie d'Alzheimer (MA) sont diagnostiqués par an. Cette maladie n'est pas un processus normal de vieillissement jusqu'à 5% des personnes atteintes peuvent en souffrir dès l'âge de 40-50 ans. En moyenne, la survie des personnes atteintes est de 8 à 10 ans. Actuellement, la MA est totalement incurable. Ce qui apparaît important à ce jour est de retarder l'apparition des symptômes et d'empêcher le développement de cette pathologie par une compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués. L'apparition de plaques, dues à des dépôts excessifs de fragments d'une protéine bêta-amyloïde, est un facteur majeur à l'origine de la dégradation et de la dégénérescence des neurones. Ce phénomène, sur lequel on ne peut encore agir, intervient en premier lieu dans les structures impliquées dans la mémoire, puis s'étend à d'autres régions cérébrales. Analyser dans un contexte de cerveau vivant le développement de neurones humains exposés à la forme humaine de la protéine bêta-amyloïde, représente une étape majeure pour décrypter les mécanismes cellulaires altérés dès le développement et pour trouver des pistes thérapeutiques efficaces. Une réduction importante de l'activité cholinergique a été une des premières composantes physiopathologiques identifiées dans la MA à partir d'études post-mortem. Une cible particulière pour des composés thérapeutiques est le récepteur nicotinique humain de l'acétylcholine. En effet, de récentes études démontrent son interaction avec la protéine bêta-amyloïde. Dans son ensemble, ce projet devrait permettre de grandes avancées dans le domaine de la MA et aussi plus généralement des maladies neurodégénératives. Le projet implique l'utilisation de cellules neurales humaines reprogrammées à partir de cellules souches pluripotentes induites, greffées chez la souris adulte.

Ces neurones humains exprimant ou non différentes formes polymorphes des récepteurs nicotiques greffés dans le cerveau de souris adulte seront étudiés par une analyse de leur intégration et maturation. Les connexions synaptiques que ces neurones établissent, seront analysées morphologiquement et en imagerie fonctionnelle.

Un autre type cellulaire humain très impliqué dans la MA est la microglie. Dans les études humaines d'association pan-génomique (GWAS), la moitié des gènes identifiés sont exprimés dans les cellules microgliales, dont le récepteur nicotinique, et sa forme spécifique de l'Homme, CHRFAM7A. Nous produisons ces cellules à partir de cellules humaines pluripotentes induites (hiPSC) en suivant un protocole déjà publié.

Ce projet comporte deux procédures expérimentales de sévérité modérée chez la souris adulte avec analyse *in vivo* de l'activité neuronale puis analyse des tissus de cerveaux des souris post-mortem. Les souris adultes transplantées par les neurones humains ou cellules microgliales, marqués par une protéine fluorescente, seront étudiées sur une période de 4 à 9 mois. Ce modèle animal est indispensable pour étudier cette activité neuronale. Au total, 1870 souris seront utilisées sur 5 ans. Le plan d'expérience et en particulier, le nombre d'animaux inclus ont été définis avec l'aide de statisticiens et en se basant sur des projets antérieurs, pour utiliser un minimum d'animaux et détecter des effets forts en imagerie et en analyse transcriptomiques.

Des mesures seront mises en place pour supprimer ou limiter les effets dommageables pour les animaux. Les opérations chirurgicales seront menées sous anesthésie générale. Elles seront suivies d'une période de surveillance quotidienne de l'état général avec recours à des antalgiques, autant que nécessaire. Des points limites sont définis (animal maigre, problèmes posturaux prolongés.) selon des critères bien référencés, et s'ils sont atteints et/ou que les traitements par analgésiques s'avèrent inefficaces, les animaux seront mis à mort.

15480 Les anticorps sont générés par le système immunitaire chez l'homme ou les animaux en réponse à l'exposition à un immunogène (un immunogène est une molécule capable d'induire une réponse immunitaire). Les anticorps sont retrouvés en quantité importante dans le sang.

Ils ont pour caractéristique de reconnaître spécifiquement l'immunogène contre lequel ils ont été générés et de s'y fixer.

L'objectif de ce projet est la production d'anticorps monoclonaux par des souris à des fins de recherches. Cette espèce est considérée depuis plusieurs décennies comme l'animal de choix pour sa bonne réponse immunitaire.

La spécificité des anticorps contre leur cible en fait un outil indispensable pour la détection et la quantification de molécules d'intérêt. Les anticorps ont des applications variées en recherche fondamentale pour la compréhension du monde vivant. Ils sont aussi indispensables pour comprendre et soigner de nombreuses maladies tels que certains cancers, les maladies cardiovasculaire ou neurologiques (maladie d'Alzheimer, sclérose en plaque).

De par les avancés scientifiques, le remplacement du modèle in-vivo ne peut être pour l'instant envisagé car la réponse immunitaire est un phénomène extrêmement complexe impliquant la coopération entre de multiples types cellulaires, pour lequel il n'existe pas d'équivalent in-vitro.

Dans l'objectif de réduire au maximum le nombre d'animaux nous n'utilisons que la quantité d'animaux strictement nécessaire à l'obtention des quantités d'anticorps recherchées.

De même, dans un objectif de raffinement, tous les actes réalisés le sont en conformité avec les bonnes pratiques réalisées en expérimentation animale et les recommandations édictées sur le sujet. Par ailleurs, contrairement aux anticorps polyclonaux, une fois que l'anticorps monoclonal a pu être sélectionné, celui-ci peut être sauvegardé et produit in-vitro (dans la plupart des cas) ce qui limite par la suite l'utilisation d'animaux.

En fonction des demandes que nous recevons, nous prévoyons d'utiliser jusqu'à 100 souris par an soit 500 souris sur 5 ans.

15481 L'accident vasculaire cérébral (AVC) ischémique est une pathologie neurologique survenant après l'occlusion d'une artère irriguant le cerveau. Cette pathologie est la 3ème cause de mortalité et la première cause de handicap acquis chez l'adulte dans le monde. En France, cent trente mille nouveaux cas sont répertoriés par an. L'AVC pose donc un problème majeur tant dans le domaine de la santé publique que sur le plan humain. Actuellement, la prise en charge des patients à la phase aiguë de l'infarctus cérébral est réalisée par l'injection intraveineuse de l'activateur tissulaire

du plasminogène (tPA) associée ou non à la thrombectomie. Toutefois, seule une faible proportion des patients (<10%) peut être traitée du fait des effets secondaires de l'injection de tPA et de la relative difficulté d'accès à la thrombectomie. Ainsi, il paraît indispensable de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques innovantes visant à traiter efficacement cette pathologie.

L'objectif de cette étude vise à identifier de nouveaux mécanismes impliqués dans la progression de la lésion ischémique, et dans la récupération fonctionnelle qui suit l'AVC. Pour cela, nous utiliserons le modèle d'infarctus cérébral qui reproduit au mieux la physiopathologie de l'AVC permettant une meilleure transposabilité des résultats obtenus vers la clinique ainsi qu'un modèle clairement établi d'injection d'agoniste glutamatergique dans l'hippocampe qui altère les fonctions de mémoire et d'apprentissage. L'AVC sera induit sur des souris C57BL6/J (*Mus musculus*) mâles âgées de 10 à 12 semaines, en utilisant le modèle d'AVC thromboembolique dont le principe repose sur l'injection d'un agent coagulant (la thrombine) directement dans la lumière artérielle et les injections intra-hippocampiques seront effectuées chez des souris du même âge en utilisant du NMDA, un agoniste des récepteurs NMDA.

Les modèles AVC et stéréotaxique sont aujourd'hui très bien caractérisés chez la souris et toutes les procédures seront organisées afin de se conformer à la règle des 3Rs. Ainsi toutes les manipulations douloureuses seront réalisées sous anesthésie générale avec couverture analgésique pour éviter toutes douleurs, souffrances et angoisses. De plus, les données de la littérature ainsi qu'une étude de puissance statistique en amont permettent de nous assurer que nous utiliserons le nombre minimal d'animaux pour pouvoir conclure d'un effet ou non de notre stratégie thérapeutique. Les critères d'évaluation étant pour l'AVC 1/ le suivi de la reperfusion tissulaire au cours de la première heure post AVC à l'aide d'un système d'imagerie Speckle non invasif et 2/ la mesure des lésions cérébrales à 24 heures post AVC à l'aide de l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et pour l'injection stéréotaxique mesure de lésion cérébrale par IRM 24h après injection.

Le projet fera l'objet de deux phases distinctes. La première sera une étude de l'impact du stress du réticulum et de l'autophagie sur la mémoire et l'apprentissage (un inhibiteur et un activateur pour chaque, comparé aux contrôles). La seconde sera une étude de l'impact du stress du réticulum et de l'autophagie sur l'ischémie cérébrale (un inhibiteur et un activateur pour chaque, comparé aux contrôles, avec ou sans thrombolyse par le tPA). Suite à l'analyse de puissance statistique un nombre de 909 animaux au total, répartis sur les 2 études, seront nécessaires pour l'ensemble du projet.

Cette étude, ayant recours à l'expérimentation animale, prend en compte le bien-être animal et les pratiques éthiques, et répond à la règle des 3 Rs. Ce projet correspond à l'étape de validation *in vivo* qui fait suite aux nombreuses validations réalisées *in vitro*, et ne nous permet pas d'utiliser d'autres moyens que de tester cette stratégie thérapeutique chez l'animal. L'ensemble des connaissances et des acquis dont nous disposons dans la littérature font que la souris est un modèle préférentiel pour mener à bien ce projet. En effet, la souris est une des espèces animales la plus étudiée dans le domaine de l'AVC ce qui permettra une analyse comparative et critique des résultats obtenus.

Les expériences seront réalisées par du personnel qualifié en respectant les règles de bonnes pratiques de laboratoire pour le respect des animaux, tout en veillant à ne pas dépasser les points limites fixés au préalable. Le bien-être des animaux sera suivi bi-quotidiennement par du personnel qualifié 5j/7 et quotidiennement pendant les week-ends et jours fériés et cela pendant toute la durée du projet. Les animaux seront hébergés dans des cages standards répondant aux normes européennes actuelles (Directive 2010/63/UE). Pour éviter de stresser les animaux, les cages seront isolées de tout bruit extérieur et l'accès à l'eau et à la nourriture sera *ad libitum*. Enfin, une importance particulière sera apportée au bien-être des animaux. Tout sera mis en œuvre pour réduire l'angoisse, la souffrance et la douleur de chaque animal, pouvant être occasionnées pendant le projet. Les principes éthiques et les standards de raffinement seront utilisés jusqu'à la mise à mort de l'animal.

15482 Les maladies cardiovasculaires représentent la première cause de mortalité dans le monde, aussi bien dans les pays développés que dans ceux en voie de développement. De plus, l'incidence de la mortalité cardiovasculaire augmente avec l'âge, du fait, au moins en partie, d'une augmentation de l'incidence des facteurs de risques cardiovasculaire avec l'âge.

Les maladies cardiovasculaires et leurs facteurs de risques sont associés précocement à un dysfonctionnement de l'endothélium vasculaire. Cette monocouche cellulaire située sur la face interne de l'ensemble des vaisseaux sanguins joue un rôle central dans le maintien d'un état vasculaire optimal, notamment grâce à la formation des facteurs vasoprotecteurs comme le monoxyde d'azote. La fonction endothéliale diminue avec l'âge, ce qui se traduit entre autre par une diminution de la dilatation artérielle dépendante de l'endothélium progressive au cours du vieillissement physiologique. La dysfonction endothéliale liée à l'âge, caractérisée par une diminution de la formation des facteurs vasoprotecteurs, va favoriser le développement des facteurs de risques cardiovasculaires pouvant à terme aboutir à des événements adverses tels que l'infarctus du myocarde ou l'AVC. La plupart des thérapeutiques actuelles pour la prise en charge des facteurs de risque cardiovasculaires n'ont peu ou pas d'effet sur la fonction endothéliale. Le développement d'une nouvelle approche visant à améliorer la fonction endothéliale présente donc un intérêt majeur.

Plusieurs études épidémiologiques et cliniques ont montré un intérêt des acides gras polyinsaturés omega-3 dans la prévention primaire et secondaire des maladies cardiovasculaires. En effet, la consommation d'omega-3 sous forme de poisson, d'huile de poisson ou de composés purifiés a été associée à une diminution du risque cardiovasculaire dans diverses populations à risques. Ainsi, une étude clinique a montré une diminution de la mortalité cardiovasculaire de l'ordre de 30 % chez des patients post-infarctus du myocarde recevant une formulation d'omega-3.

Le but du présent projet est d'étudier l'effet de formulations optimisées d'acides gras polyinsaturés omega-3 sur la dysfonction endothéliale liée à l'âge. Pour ce faire, des rats âgés respectivement de 12 semaines (jeunes), et d'environ 7 mois (moyennement âgés) et 20 mois (âgés) recevront quotidiennement par voie orale soit une formulation optimisée en omega-3, une huile contrôle ou de l'eau pendant 7 ou 14 jours, avant de déterminer la (dys)fonction endothéliale et les répercussions vasculaires dans divers organes (reins, cœur, poumons, aorte, artères et veines fémorales, etc.) en utilisant des techniques de réactivité vasculaire ex vivo, de biochimie, de biologie moléculaire et d'histologie.

Le nombre maximal d'animaux utilisés pour ce projet est de 380 rats du fait de l'application de la règle des 3R. Le remplacement du modèle animal par un autre modèle n'est pas possible du fait que le vieillissement physiologique est un processus complexe issu des interactions multi-tissulaires dans l'organisme. Toutefois, la mise au point des formulations optimisées en oméga 3 et l'identification de certains mécanismes moléculaires ont été faits à l'aide de méthode alternative. La réduction des effectifs est liée à l'utilisation de techniques et à une approche statistique adaptées (ANOVA et/ou test non-paramétriques). Enfin, le raffinement se fait par une prise en compte du bien-être animal (enrichissement du milieu et soins quotidiens aux animaux).

15483 La dynamine 2 (DNM2) est une protéine largement exprimée impliquée dans de nombreux processus cellulaires. Des mutations génétiques sur la dynamine 2 ont été associées à différentes maladies : une neuropathie périphérique de Charcot Marie Tooth (CMT) et une myopathie centronucléaire (CNM). D'autres études ont également montré des défauts à la fois au niveau des structures musculaires et des nerfs périphériques, ce qui suggère qu'un mécanisme commun pourrait être affecté dans les deux maladies (CMT et CNM). Le but de cette étude est de comprendre dans quelle mesure et comment DNM2 participe aux fonctions nerveuses, musculaires et autres fonctions physiologiques.

Compte tenu des fonctions physiologiques de DNM2 et de sa forte implication dans les fonctions neuromusculaires, nous proposons un large phénotypage d'une lignée de souris portant une mutation spécifique chez le patient. Cette mutation est la deuxième mutation la plus fréquente de DNM2, conduisant à la forme grave de maladies neuromusculaires accompagnée d'une forte faiblesse musculaire. Les patients ont été classés comme présentant principalement une

myopathie. Cependant, nos données préliminaires sur la fonction motrice et l'analyse de la force musculaire ont montré une faiblesse musculaire et une stimulation nerveuse anormale conduisant à une contraction musculaire irrégulière suggérant que cette lignée de souris présente un mélange de neuropathie (CMT) et de myopathie (CNM). Ainsi, un phénotypage approfondi pourrait potentiellement révéler l'impact de cette mutation commune.

Plusieurs procédures expérimentales seront réalisées avec un maximum d'un test par jour. Le nombre d'animaux sera réduit au maximum pour obtenir une puissance statistique suffisante. Ainsi, 14 souris mutantes et 14 souris contrôles par groupe seront nécessaires pour obtenir une étude concluante (REDUCTION). Au final, en tenant compte des animaux d'expériences et des géniteurs, 40 souris sont nécessaires.

Pour ces travaux il est indispensable d'utiliser la souris car seul le modèle animal permet d'étudier d'une part la physiopathologie et d'autre part l'amélioration des symptômes (REPLACEMENT).

Les myopathies sont des maladies qui affectent les muscles pouvant entraîner des difficultés pour se déplacer, de la nourriture sera placée dans la cage. Afin de s'assurer que les animaux ne souffrent pas, ils seront surveillés quotidiennement. Tout signe de douleur sera pris en charge en prenant les mesures appropriées en fonction du niveau de douleur observé (soit un analgésique sera administré, soit les animaux seront euthanasiés prématurément si nécessaire) (RAFFINEMENT).

15484 La production d'anticorps monoclonaux est un service proposé par notre société. Les anticorps monoclonaux sont des outils indispensables en recherche fondamentale mais ils ont aussi des applications thérapeutiques dans des pathologies tel que le cancer ou les maladies neurodégénératives.

La méthode de première intention pour la production d'anticorps monoclonaux est la méthode *in vitro*. Cependant certaines cellules productrices d'anticorps ne sécrètent pas ou que très peu dans un système *in vitro*. Dans ce cas, nous devons avoir recours à une production *in vivo* la production en liquide d'ascite chez la souris.

La production d'anticorps monoclonaux en liquide d'ascite chez la souris est une méthode classique qui permet d'obtenir des solutions concentrées en anticorps.

Cette méthode consiste à provoquer une inflammation de la cavité péritonéale (phase d'amorçage) puis à y injecter les cellules sécrétrices d'anticorps (hybridomes), ce qui provoque le développement d'une ascite (une accumulation de liquide dans la cavité péritonéale)

Après un laps de temps de 7 à 14 jours les souris sont mises à mort et le liquide d'ascite (qui contient les anticorps) est prélevé.

Cette méthode permet d'obtenir des solutions beaucoup plus concentrées en anticorps que les méthodes *in vitro*. Cependant la phase d'amorçage, l'accumulation de liquide d'ascite, éventuellement la formation de tumeurs solides causent une douleur et une souffrance dont la classe de gravité peut aller jusqu'à sévère.

Par conséquent, le recours à la méthode *in vivo* n'est utilisé que lorsque les méthodes alternatives sont inefficaces.

Afin de limiter au maximum la douleur et la souffrance des animaux, nous avons pris le parti de suivre une procédure qui minimise autant que possible ses conséquences sur les animaux, dans un laps de temps le plus court possible, utilisant le moins d'animaux possible. De plus un suivi strict des animaux est mis en place pour s'assurer qu'aucun animal n'est atteint de points limites.

Tout animal atteignant les points limites définis (signes détresse et / ou de douleur (pilo-érection, dos voussé, détresse respiratoire, diminution de l'activité, vocalisations, yeux mi-clos, oreilles en arrière) ou pour lesquels une masse tumorale est visible et / ou palpable) est mise à mort après une anesthésie lourde et profonde.

Ainsi, nous prévoyons d'utiliser 10 000 souris/an sur une durée de 5 ans, prévues pour produire plusieurs anticorps monoclonaux différents. L'expérimentation suivra également les recommandations du Comité national de réflexion d'éthique en expérimentation animale.

15485 La présente étude vise à évaluer le rôle des espèces animales introduites (espèces domestiques introduites volontairement, ou espèces commensales de l'Homme introduites accidentellement) dans les processus épidémiologiques en utilisant comme modèles les systèmes insulaires subantarctiques. L'étude sera conduite sur une durée de 4 ans dans les terres australes, où réside une importante diversité d'espèces d'oiseaux et mammifères marins menacées, ainsi que plusieurs espèces de mammifères introduits. Par ailleurs, certaines populations aviaires sont touchées de manières récurrentes par des épizooties (notamment de choléra aviaire, causé par la bactérie *Pasteurella multocida*) causant la mort d'une importante proportion des poussins d'espèces menacées d'albatros et de manchots. L'étude sera focalisée sur trois espèces de mammifères introduits potentiellement hôtes d'agents infectieux pathogènes pour les oiseaux et mammifères marins le rat brun (*Rattus norvegicus*), le rat noir (*Rattus rattus*) et la souris grise (*Mus musculus*). Le rôle de ces espèces dans la prédation, la compétition et la destruction de l'habitat des espèces natives est connu, mais peu d'informations sont disponibles sur leur rôle potentiel dans l'introduction, le maintien et la circulation d'agents infectieux pathogènes pour les espèces natives, notamment en milieu subpolaire où la forte saisonnalité a probablement un impact important sur la dynamique de ces populations non-indigènes. L'étude consistera en la capture d'individus in situ puis à leur mise à mort afin de réaliser des prélèvements invasifs (sang, organes internes et muqueuses externes) permettant d'évaluer leur statut infectieux et excréteur pour différents agents infectieux (en particulier *P. multocida*, *Leptospira* spp. et *Toxoplasma gondii*). Elle concernera un total de 720 individus : 240 rats bruns, 160 rats noirs et 320 souris grises. Cette étude sera conduite en parallèle d'études éco-épidémiologiques à long terme conduites sur les espèces natives débutées en 2013 et des protocoles de suivi et de contrôle des populations (partiel ou éradication totale) des différentes espèces ciblées préexistants dans le cadre des actions de conservations des espèces natives locales. L'étude permettra donc la valorisation scientifique des individus d'espèces introduites mis à mort à des fins de conservation.

Les protocoles expérimentaux ont été élaborés en prenant en compte la règle des 3 R. L'étude porte spécifiquement sur la circulation d'agents infectieux dans des populations sauvages de mammifères introduits en subantarctique; elle ne peut donc être conduite que dans les populations non-captives concernées. Les tailles d'échantillons ont été déterminées en considérant les critères de réduction et de raffinement pour permettre des comparaisons pertinentes des taux d'exposition aux agents infectieux entre sous-populations et saisons. À noter que les nombres d'individus manipulés dans le cadre de cette étude sont bien inférieurs aux nombres d'individus mis à mort dans le cadre des protocoles de contrôles des espèces introduites. Les tailles de populations de rongeurs étant sujettes à d'importantes variations interannuelles, potentiellement impactant la dynamique des agents infectieux qu'elles portent, l'échantillonnage devra être conduit sur au moins deux ans sur chaque site. L'échantillonnage sera focalisé sur les sous-populations d'intérêts, c'est-à-dire résidant proches des zones de reproduction ou d'alimentation des espèces natives. Les protocoles expérimentaux ont été élaborés afin de minimiser la douleur et l'inconfort des animaux. Les animaux seront capturés en utilisant des pièges non-létaux (cages) puis mis à mort en utilisant une méthode approprié pour leur masse. Le modèle, la disposition et le plan de déploiement des cages seront adaptés à chaque espèce afin de limiter le risque de captures accidentelles et de blessure des animaux. Les pièges cages seront déployées seront contrôlés dans les heures suivant le déploiement à la tombée de la nuit et contrôlées au lever du jour afin de limiter le temps de captivité pour les animaux. Tous les prélèvements seront réalisés après la mise à mort afin de réduire le temps de manipulation des animaux vivants.

15486 L'évaluation des effets toxiques des contaminants environnementaux est complexe car elle doit considérer la nature des composés toxiques, leurs propriétés toxicodynamiques, la durée d'exposition et ses variations, les conséquences des expositions durant les périodes sensibles du développement. Les atteintes chroniques dans lesquelles ces contaminants sont suspectés sont dénoncées par de nombreux scientifiques. Cependant les études de risque prévues pour tester la toxicité de ces composés sont insuffisantes pour objectiver leurs dangers potentiels, pour comprendre les mécanismes de leur toxicité et en dernière instance pour développer des politiques de protection de ces dangers. La prolifération des cyanobactéries dans les milieux aquatiques se

rencontre sur l'ensemble du territoire Français et constitue un réel problème de santé publique, principalement lorsque les plans d'eau sont utilisés pour l'alimentation en eau potable ou pour des activités de loisirs aquatiques. La prolifération de ces algues se traduit par une hausse des concentrations environnementales en cyanotoxines. L'une d'elles, la β -N-méthylamino-L-alanine (L-BMAA), aux propriétés neurotoxiques qui est fortement suspecté d'être lié à l'étiologie de plusieurs maladies neurodégénératives telles que la Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA), la maladie de Parkinson ou encore la maladie d'Alzheimer. Cette prolifération est liée aux températures élevées et à l'eutrophisation. Elle semble aussi associée à la présence d'herbicides, tels que le Glyphosate (GLY) et le Glufosinate (GLA), du fait que les cyanobactéries y sont fortement résistantes. Ces deux molécules sont de plus elles aussi des analogues structuraux d'acides aminés et ont montré des actions pro-inflammatoires et neurotoxiques. Nos travaux récents ont montré l'effet toxique de l'exposition à de faibles doses de BMAA au cours du développement embryonnaire (sans développement de SLA) associé à une toxicité génétique. Les actions du GLY et du GLA, en association à la BMAA pourraient être la cause de l'émergence de ces pathologies neuro-inflammatoires constatées dans les zones d'agriculture intensive présentant une prolifération de cyanotoxines. Potentiellement, ces faibles doses de toxiques en mélange pourraient conduire à des dommages neurodégénératifs avec pour conséquence des désordres moteurs. Nous nous attendons donc à des dommages principalement d'ordre moteurs (modification des capacités de locomotion, d'endurance)

L'objectif du projet est donc d'étudier les effets neurologiques et inflammatoires induits par ces toxines de l'environnement analogues d'acides aminés suite à des expositions à faibles doses, associées ou non à une inflammation périphérique. Les approches neurotoxicologiques chercheront le lien entre l'inflammation périphérique et les effets cérébraux et entre les effets neuro-inflammatoires et les effets neurologiques. Les procédures impliquant les animaux vivants seront des procédures d'analyse du comportement. Un ensemble de tests comportementaux permettront d'évaluer l'apparition ou non d'anomalies comportementales. Les analyses moléculaires auront lieu à la fin des procédures comportementales.

Notre hypothèse de travail principale est directement liée au concept d'exposome (effet de mélanges de molécules représentatifs des expositions environnementales), soulignant que l'étude d'un seul toxique isolément ne reflète pas la circonstance réelle d'exposition humaine. Dans le cadre de ce projet, nous utiliserons une approche de recherches multidisciplinaire impliquant des méthodes *in vivo* et *in vitro* (non présentées ici) aboutissant à 1) déterminer des "Adverse Outcome Pathway" (AOP) (ce terme de la réglementation internationale définit la succession des voies moléculaires conduisant à la mise en place d'une pathologie suite à une exposition à un toxique) pertinents pour l'origine des maladies neurales, 2) mieux caractériser les effets neurotoxiques tardifs liés aux expositions simples/multiples chez la souris.

L'ensemble de ce projet a été préalablement évalué scientifiquement et fait l'objet d'un financement ANR. Une attention particulière sera accordée au respect de la règle des 3R,

-Réduire les approches comportementales nécessitent des cohortes de l'ordre de 12 animaux par groupe. Afin de minimiser le nombre total d'animaux, chaque groupe utilisé dans la procédure 1 non invasive sera ensuite réutilisé dans les procédures 2 et 3.

Le nombre total d'animaux envisagé initialement est de 2016 souris. Les animaux seront analysés du point de vue comportementale afin de rechercher la mise en place principalement de troubles moteurs.

-Remplacer une partie de ce projet ANR consiste aussi en la mise au point de procédure de culture cellulaire *in vitro* en 3 dimensions (neurosphères) en vue de la comparaison « modèle neurosphères murines » versus « modèle neurosphères humaines » pour se diriger vers un remplacement et de permettre un criblage *in vitro* à partir de cellules humaines (si ces comparaisons sont validées, le modèle neurosphères permettra de réduire considérablement l'utilisation du nombre d'animaux dans nos approches futures. Un cerveau de souriceau nouveau né conduisant à la production de 192 neurosphères, qui sont à considérer comme des échantillons/ « individus » indépendant).

-Raffiner Lors des différentes procédures, les animaux seront quotidiennement suivis. Une grille de scoring est mise en place pour l'évaluation d'une éventuelle souffrance des animaux. Si les animaux présentent un des signes de souffrance dépassant le point limite défini dans le scoring, ils seront mis à mort.

15487 L'imagerie fonctionnelle cérébrale permet de relier les différentes structures du cerveau à des fonctions spécifiques. C'est un outil de choix autant sur le plan fondamental que pour l'étude des pathologies et la mise en place de stratégies thérapeutiques associées. L'étude du sommeil s'inscrit dans ce cadre car elle renseigne sur les mécanismes physiologiques fondamentaux qui sous-tendent ses nombreuses fonctions (restauration, mémoire) mais aussi sur le fonctionnement de structures qui dysfonctionnent dans de nombreuses pathologies comme l'épilepsie.

Actuellement, les techniques de référence pour l'étude du sommeil sont l'IRM fonctionnelle chez l'homme et les primates non-humains, d'une part, et les enregistrements électrophysiologiques dans les modèles rongeurs, d'autre part. Ces deux techniques présentent des limitations importantes. L'IRM fonctionnelle est coûteuse et peu adaptée à l'étude du sommeil tandis que l'électrophysiologie souffre d'une faible résolution spatiale et de la nécessité d'un geste invasif. L'imagerie ultrasonore fonctionnelle propose donc une alternative intéressante car elle combine une bonne résolution spatiotemporelle et une grande portabilité permettant la comparaison directe entre l'activité d'éveil et celle de sommeil.

Le but de ce projet est d'étudier le lien entre activité cérébrale d'éveil et de sommeil, et de distinguer les parts relatives des composantes mnésiques, motrices et restauratrices dans les différentes phases de sommeil. Pour ce faire, cette étude nécessitera 60 rats au travers de 7 procédures. Ce projet implique une procédure chirurgicale comprenant craniotomie, implantation d'électrodes (EEG-EMG-EOG, afin d'enregistrer et de classifier les différentes phases de sommeil) et pose d'une prothèse perméable aux ultrasons, ce qui permettra le suivi chronique de rongeurs sur une fenêtre de temps prolongée (2 à 6 semaines). L'une des grandes originalités du projet est de pouvoir suivre le couplage entre signaux vasculaire et électrique dans l'ensemble du cerveau et ce, lors de différents états de vigilance, pour aboutir à une cartographie fonctionnelle du sommeil à grande échelle. Le modèle rongeur (rat) utilisé est un modèle d'étude privilégié en neurosciences, notamment pour les études comportementales. Cette technique est déjà transposable chez le nouveau-né et en peropératoire chez le sujet adulte, mais n'est pour l'heure pas transposable chez le sujet humain sain car elle nécessite de passer la paroi osseuse.

Le projet s'inscrit pleinement dans la démarche des 3R pour le bien-être des animaux

- Réduire au minimum le nombre d'animaux par l'analyse statistique préalable sur la taille des groupes requises pour réaliser l'étude avec significativité et par l'optimisation de l'utilisation des animaux grâce à la mise en place d'un protocole d'imagerie chronique.
- Raffiner les manipulations par l'utilisation d'une technique minimalement invasive. La chirurgie sera nécessaire pour obtenir une bonne qualité d'imagerie dans les structures profondes. Elle sera pratiquée sous anesthésie générale avec analgésie au décours pour maîtriser la douleur post-opératoire.
- Une surveillance régulière sera effectuée auprès des animaux afin de s'assurer de leur bien-être constant. Les animaux seront hébergés dans des cages dans des armoires ventilées, avec enrichissement du milieu de type tunnel en carton.
- Il nous est malheureusement impossible de remplacer l'animal car nous avons besoin d'un système biologique intègre du cerveau pour la mesure de l'activité cérébrale.

15488 Les implants sont des systèmes thérapeutiques qui permettent une libération prolongée du médicament dans le temps. Ces systèmes sont placés sous la peau pendant plusieurs mois et évitent ainsi la prise quotidienne de médicaments pour le patient. Ils sont déjà utilisés pour des médicaments anticancéreux ou contraceptifs. Ces implants contiennent le plus souvent des ingrédients dérivés du pétrole et nécessitent pour leur fabrication l'utilisation de solvants chimiques ceci a par conséquent un impact sur l'environnement. Nous avons développé une alternative plus

écologique des implants composés exclusivement d'huile végétale et de silice. Ces ingrédients présentent l'avantage d'être d'origine naturelle et d'être facilement dégradés par les organismes et dans l'environnement. De plus les procédés pour fabriquer les implants à base d'huile végétale et de silice n'engendrent aucune toxicité car tout se réalise dans l'eau contrairement aux implants actuellement utilisés. Enfin, ces ingrédients sont compatibles avec un grand nombre de médicaments et peuvent permettre de fabriquer des implants de différentes formes et tailles, comme par exemple, sous forme de microbilles. L'avantage des implants microbilles est qu'elles peuvent se disperser dans une solution physiologique et leur dépôt sous la peau s'effectue à l'aide d'une simple seringue car leur petite taille leur permet de passer dans une aiguille.

Nous avons développé des implants sous forme de microbilles et piégé dans leur cœur une hormone l'estradiol. Nous avons prouvé sur des cellules de différentes natures l'absence de toxicité des microbilles. Nous avons également prouvé que les implants étaient capables de libérer la molécule piégée de façon prolongée dans le temps par des études simulant les conditions à l'intérieur d'un organisme.

Ces microbilles sont destinées à être implantées sous la peau pour laisser diffuser un médicament, en vue d'une application chez l'homme. Le but de notre projet est de s'assurer qu'elles n'aient pas d'effets toxiques, c'est-à-dire qu'elles n'entraînent pas de réactions inflammatoire et/ou allergiques, et qu'elles soient parfaitement compatibles avec les tissus environnants (biocompatibles). De plus nous souhaitons vérifier que la molécule piégée au cœur des microbilles, l'estradiol, se libère bien.

Pour cela, nous devons tester nos implants sur des organismes vivants. Nous avons décidé de réaliser cette étude sur un modèle complexe tel que la souris, qui est le modèle couramment utilisé dans des études de biocompatibilité. Il n'est pas possible d'utiliser des méthodes alternatives à l'expérimentation animale, car les réactions peuvent être multiples, à la fois inflammatoires et allergiques, et de nombreux paramètres physiologiques doivent être suivis. Il n'y a donc pas de remplacement possible ni complet ni relatif, car il est obligatoire d'avoir un modèle mammifère. Nous envisageons de mettre en place une réduction maximale du nombre d'animaux. Le nombre d'animaux par groupe sera 6 afin d'avoir des résultats avec une significativité statistique. Le nombre total d'animaux prévus dans ce projet sera de 36 souris au total.

Le raffinement sera mis en place au cours des deux procédures expérimentales afin de respecter le bien-être animal. Les animaux traités avec les microbilles recevront une simple injection sous la peau. Dans la procédure 1, ils ne subiront aucun prélèvement jusqu'à leur euthanasie, tandis que dans la procédure 2, des prélèvements sanguins seront effectués. Nous avons déjà obtenu des résultats encourageants en prouvant que ces microparticules n'entraînaient pas de toxicité sur différentes cellules. Le traitement donc est censé être peu ou pas toxique pour l'animal. Les animaux seront surveillés de façon visuelle (pelage, yeux, bouche) et non visuelle (pesée, prise de température corporelle). Des points limites seront établis afin d'éviter toute souffrance animale. Les souris seront dans une animalerie climatisée, hébergées dans des cages aux dimensions adaptées et pourront s'alimenter à volonté.

Les animaux seront anesthésiés avant euthanasie, puis des prélèvements de tissus seront réalisés afin d'effectuer de nombreuses analyses.

15489 La maladie de Parkinson (MP) est une maladie neurodégénérative chronique qui touche 1 % de la population après 65 ans. Au total, entre 100 000 et 120 000 personnes sont touchées en France, et environ 8 000 nouveaux cas se déclarent chaque année. Et compte tenu du vieillissement de la population, l'incidence de la maladie progresse.

Cette maladie touche les neurones dopaminergiques dans une région du cerveau profonde appelée "substance noire" qui dégénère progressivement. La mort de ces cellules s'accompagne de perturbations des réseaux de neurones qui leurs sont associés dans différentes zones du cerveau. La dégénérescence des neurones dopaminergiques serait favorisée par des facteurs génétiques et environnementaux et les mécanismes précipitant cette dégénérescence sont vraisemblablement multiples. La MP est une maladie chronique, d'évolution lente et progressive, dont le début est insidieux. Les patients restent asymptomatiques jusqu'à ce que 50 à 70% des neurones

dopaminergiques soient détruits et que le cerveau ne soit plus en mesure de compenser. La conséquence est, entre autres, l'apparition de la triade classique de symptômes moteurs caractéristique de cette pathologie, à savoir rigidité, akinésie et tremblement de repos. La prise en charge actuelle de la maladie de Parkinson consiste à compenser le déficit en dopamine mais ce traitement est uniquement symptomatique et s'accompagne sur le long terme d'effets secondaires tels que des dyskinésies, c'est-à-dire des mouvements anormaux et involontaires.

Dans ce projet, un modèle neurotoxique chez le rongeur (*Rattus Norvegicus*) récapitulant les caractéristiques anatomopathologiques et les principaux symptômes de la pathologie, sera utilisé. D'un point de vue pharmacologique, ce modèle développe également des mouvements anormaux après un traitement semblable à celui utilisé chez l'Homme. Nous proposons d'utiliser des techniques d'électroencéphalographies (EEG) afin d'offrir des biomarqueurs pertinents, accélérant ainsi le développement de nouvelles molécules anti-parkinsoniennes et anti-dyskinétiques. Ce projet est basé sur des études cliniques ayant mis en évidence des modifications de l'activité cérébrale chez des patients atteints de la MP. Ces modifications sont également retrouvées dans le modèle rongeur utilisé dans ce projet. Ces biomarqueurs EEG ont un fort pouvoir translationnel et vont permettre d'évaluer plus efficacement le potentiel thérapeutique de nouvelles molécules en développement dans des protocoles dit aigus et chroniques.

Pour ce projet, nous pensons utiliser 60 lots avec pour chaque lot, l'utilisation de 20 rats, soit 1200 rats sur 5 ans.

Réduction Ce nombre d'animaux a été déterminé de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en gardant un nombre suffisant pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées. De plus, les animaux sont traités en plan d'étude croisé. Chaque animal possède deux voies d'enregistrement permettant ainsi de réaliser les enregistrements même si un canal d'enregistrement devient inexploitable.

Raffinement Le projet implique la mise en place d'un système d'enregistrement EEG chez le rongeur avec une chirurgie de classe modérée. Cependant, l'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à une grille codifiant le niveau de douleur. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

Remplacement Ce projet a pour but de mesurer l'efficacité de composés sur des marqueurs pathologiques dans un organisme complet et complexe. De ce fait, il est impossible de remplacer notre préparation *in vivo* par un modèle cellulaire ou une simulation computationnelle.

15490 Les accidents survenant au niveau d'une centrale nucléaire ont pour conséquence principale le rejet dans l'environnement de fortes quantités de radioactivité sous forme de particules et gaz radioactifs pouvant contaminer les populations exposées. Parmi les isotopes présents dans les rejets, figurent notamment l'iode 131 et d'autres isotopes à vie courte de l'iode. L'exposition des populations aux iodes radioactifs est notamment associée à une augmentation de cancers de la thyroïde. Les conséquences sanitaires liées à l'exposition aux iodes radioactifs peuvent néanmoins être limitées par l'ingestion de comprimés d'iode stable. Idéalement, cette administration doit intervenir deux heures avant l'exposition au panache radioactif. Cette mesure préventive est efficace en cas d'exposition ponctuelle comme lors du passage d'un nuage radioactif. Toutefois, lors de la récente catastrophe de Fukushima Dai-ichi, les autorités sanitaires ont été confrontées à un relargage répété d'iode radioactif et, dans le cas d'une exposition répétée, une prise d'iode stable unique en prophylaxie n'est pas appropriée. En raison du déficit de connaissances quant aux modalités d'administrations répétées d'iode stable pour assurer une protection efficace, les autorités sont en fait démunies face à des situations de rejets chroniques d'iodes radioactifs. De plus, les effets secondaires engendrés par ces administrations réitérées sont mal connus mais une surcharge continue en iode est certainement à éviter. Pour établir une procédure de prophylaxie adaptée, nous avons mené un projet de recherche qui nous a permis de déterminer les modalités d'administrations répétées d'iode stable en situation de rejets radioactifs chroniques afin de faire évoluer l'actuelle autorisation de mise sur le marché des comprimés d'iodure de potassium (KI). Cependant, l'ensemble de la population susceptible d'être exposée aux rejets radioactifs devrait bénéficier d'une telle mesure de protection, en veillant à protéger les femmes enceintes (protection du fœtus) et les

jeunes de moins de 18 ans. Pour cela, notre équipe va plus spécifiquement s'intéresser aux effets protecteurs d'une administration répétée d'iode stable sur la thyroïde des souris gestantes et de leurs embryons ainsi que l'effet sur l'activité thyroïdienne des jeunes animaux dont la mère a reçu une administration répétée d'iode stable durant la gestation. Pour réaliser cette étude, nous planifions d'utiliser 102 souris gestantes, 54 souris non gestantes et 216 souriceaux pour des expériences d'imagerie isotopique (soit 372 animaux). Les animaux seront suivis par des techniques d'imagerie isotopique *in vivo* puis sacrifiés. Remplacement : des études *in vitro* ne sont pas possible à cause de la complexité des systèmes biologiques étudiés. Raffinement : l'utilisation de la technique d'imagerie isotopique non invasive SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography) permet de suivre *in vivo* des cellules accumulant de l'iode. La capacité d'accumulation d'iode est mesurée avec du ^{99m}Tc-pertechnétate non métabolisé dans les hormones thyroïdiennes. L'iode ¹²³I est utilisé pour la quantification de l'accumulation et de l'organification de l'iode dans les hormones. Elle permet également d'effectuer plusieurs enregistrements répétés sur un même animal et ainsi diminuer considérablement le nombre d'animaux nécessaires. De plus, les animaux seront hébergés dans une zone spécifique agréée. Ils évolueront dans un environnement adapté à leur espèce. Des cages de surface réglementaire avec nourriture et eau ad libitum, maisons et morceaux de bois pour nidification seront utilisées. Réduction : le nombre d'animaux a été choisi en suivant un modèle de calcul statistique permettant de définir le nombre de souris suffisant pour l'obtention de résultats significatifs. Durant les expériences d'imagerie, les animaux sont anesthésiés dans un environnement contrôlé. Un système de contrôle de ventilation pulmonaire sera utilisé pour surveiller continuellement l'état de l'animal durant la phase d'anesthésie. Les animaux seront suivis tout au long du protocole. De la phase d'acclimatation, à la phase d'expérimentation puis post-expérimentation. Des fiches de suivi ont été établies sur les conseils de la Structure du Bien-Etre Animal du site. Des points limites ont été établis spécifiquement pour cette expérimentation qui permettront d'assurer au mieux le bien-être de l'animal afin d'éviter toute souffrance inutile. Toutes ces expérimentations seront réalisées par un personnel formé et qualifié pour les techniques utilisées.

15491 Les maladies auto-immunes représentent actuellement un problème de santé publique majeur dont la prévalence augmente dangereusement notamment à cause d'un accroissement de l'exposition à des facteurs de risques et du vieillissement des populations. Environ 3 à 5% de la population est affectée par ce type de pathologies, la maladie auto-immune de la thyroïde et le diabète de type I étant les plus fréquentes. Les manifestations cliniques de ce groupe de maladies sont très diverses et peuvent apparaître sous la forme d'épisodes aigus et/ou chroniques. Ces symptômes peuvent être localisés au niveau de certains organes (les articulations dans le cas de la polyarthrite rhumatoïde) ou être systémiques c'est à dire généralisés (pour le lupus érythémateux par exemple). Toutefois, la présence d'auto-anticorps dirigés contre des molécules du soi est une caractéristique commune à la majorité de maladies autoimmunes. L'incapacité du système immunitaire à distinguer les molécules du soi des molécules du non-soi est due à une rupture de la tolérance et conduit au développement d'une réponse immunitaire délétère contre des composants essentiels du soi l'organisme, via son système immunitaire censé le protéger, s'attaque donc à lui-même.

Malheureusement, les immunothérapies/ traitements disponibles à l'heure actuelle reposent sur une immunosuppression globale de la réponse immunitaire, ce qui présente de nombreux effets secondaires comme une haute susceptibilité aux infections et l'apparition de cancers. De plus, ces traitements nécessitent souvent de multiples injections car ils adressent uniquement les symptômes sans soigner la cause de ces maladies. Par conséquent, le développement de nouvelles alternatives thérapeutiques plus efficaces, plus spécifiques voire ciblées, et ce sur le long terme semble crucial.

L'objectif est de réduire le système immunitaire du patient, par thérapie génique des cellules du système immunitaire, pour lui ré-apprendre à différencier correctement le soi du non soi et surtout à ne plus s'attaquer à ses propres cellules. Le modèle de polyarthrite rhumatoïde (PR) a été choisi pour cette étude.

Règle des 3R : Pour atteindre les objectifs de ce projet, il n'existe pas de méthode alternative reproduisant les différents mécanismes responsables de la PR n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptible d'apporter le même niveau d'information.

Le nombre de souris utilisées a été calculé comme étant nécessaire et suffisant pour pouvoir analyser statistiquement les résultats.

La PR sera induite chez les souris sauvages par injection de collagène. Les souris seront traitées par greffe de cellules génétiquement modifiées, ou « reprogrammées », l'objectif étant d'améliorer / retarder les symptômes cliniques et la pathologie PR.

Un suivi des animaux (cliniques et paramètres physiologiques) aura lieu au moins une fois par semaine (jusqu'à 4 fois par semaine lors des étapes tardives de la pathologies) afin d'évaluer le bien-être animal et d'intervenir de manière rapide et appropriée en cas de nécessité. Les points limites, associés au suivi approprié, sont adaptés au modèle PR et suffisamment prédictifs pour éviter toute souffrance animale. Les analgésiques appropriés seront utilisés tout au long de la procédure. Des aliments et de l'eau gélifiée seront déposés à différents endroits de la cage pour faciliter l'alimentation des souris.

Le nombre de souris nécessaires pour ces expériences est évalué à 2054 maximum sur 5 ans. Cependant, les expériences prévues seront réalisées de manière séquentielle afin de diminuer au possible le nombre d'animaux utilisés en tenant compte des résultats de expériences précédentes. Les manipulations seront répétées une seule fois si nécessaire pour renforcer les analyses statistiques.

15492 Au cours de leur prise en charge thérapeutique, environ un patient sur deux atteint d'un cancer recevra un traitement par radiothérapie (RT).

Les techniques de RT ont beaucoup évolué durant les 15 dernières années et permettent à l'heure actuelle de délivrer de hautes doses de radiations au niveau de la tumeur tout en évitant au maximum les organes sains avoisinants afin de réduire les toxicités.

Jusqu'à récemment, et de façon surprenante, les techniques de RT disponibles pour les projets de recherche sur le petit animal n'ont pas suivi cette évolution technologique. Ainsi les projets de recherche précliniques utilisant de la RT délivraient aux animaux un traitement comparable à ceux délivrés aux patients dans les années 1980.

Depuis 2016, notre établissement a fait l'acquisition d'un appareil de radiothérapie 3D guidé par l'image pour le petit animal permettant de délivrer des traitements similaires à ceux délivrés aux patients. En parallèle à cette évolution technologique, de nouvelles molécules ou dispositifs ont été développés (nano-médicaments, immunothérapies...) et leur association avec de la RT est très prometteuse.

De nombreux industriels ou chercheurs souhaitent à présent optimiser l'association de telles molécules avec de la RT moderne. Notre plateforme leur propose ainsi des prestations de services de RT préclinique afin de développer de tels projets. Les partenaires auront dans un premier temps obtenu des résultats *in vitro* qui auront permis de fixer les doses de molécules et de RT à tester *in vivo*, les plus efficaces possible (Remplacement).

Les rats, qui arriveront dans notre service pour être irradiés, seront déjà porteuses de tumeurs murines ou humaines. Les traitements par RT pourront être délivrés en une fraction unique ou en une fraction par jour sur un maximum de 21 jours. Les séances de radiothérapie sont réalisées sous anesthésie gazeuse et dureront entre 1 et 20 minutes selon la dose délivrée.

Pour certains traitements, des techniques complexes nécessiteront l'acquisition d'une imagerie par scanner avant traitement par RT. Dans ce cas, les animaux seront anesthésiés durant au maximum 50 minutes, temps nécessaire pour réaliser le scanner, préparer et délivrer le traitement par RT.

Afin de limiter le stress des animaux traités sur plusieurs jours (plusieurs séances de RT) nous pourrons les héberger et les suivre quotidiennement dans l'animalerie de notre établissement durant la durée du traitement afin de leur éviter des transports quotidiens (Raffinement). Pour les cinq prochaines années nous prévoyons de réaliser ce type de prestation de service pour 10 expériences

par an avec en moyenne 25 animaux irradiés par expérience. Les groupes contrôles seront transportés et hébergés au même endroit que les groupes traités afin de limiter la variabilité des résultats et ainsi de réduire le nombre de rats nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement fiables (Réduction)

Ainsi jusqu'à 250 rats par an pourront être irradiés, durant 5 ans. Cette présente demande concerne donc 1250 rats.

15493 Il existe plus de 200 maladies neuromusculaires différentes tant par la gravité de l'atteinte musculaire que par ces conséquences sur l'organisme. Notre axe de recherche cible les maladies génétiques rares qui touchent les muscles dont les myopathies font partie. Ces maladies neuromusculaires entraînant une dégénérescence et une nécrose du tissu musculaire réduisant drastiquement l'espérance de vie.

Les mutations qui affectent les gènes Bin1 et MTM1 sont responsables de myopathies centro nucléaire. Ces deux mutations ont déjà été caractérisées, par notre équipe, lors de précédentes études. Pour contrecarrer la pathologie induite par une mutation du gène qui code pour MTM1 nous souhaitons apporter une thérapie par croisement avec une autre souris mutante portant une mutation sur le gène qui code pour une enzyme la PI3K-c2b. En effet, un dysfonctionnement de cette enzyme conduirait à son inactivation et à réduire l'accumulation de phospholipides phosphorylés provoqué par la mutation de MTM1. De plus, nous souhaitons également étudier les conséquences de la mutation du gène Bin1 car, il a été démontré l'étroite relation entre Bin1 et MTM1 comme étant sur le même circuit de régulation et donc vérifier si cette même stratégie peut potentiellement apporter une amélioration sur cette mutation.

Les souris seront soumises à une série de tests comportementaux pour déterminer les conséquences de ce croisement génétique. De plus, une analyse biomoléculaire et histologique sera réalisée dans le but de mettre en évidence l'efficacité de cette thérapie.

Plusieurs procédures expérimentales seront réalisées avec un maximum d'un test par jour. Le nombre d'animaux sera réduit au maximum pour obtenir une puissance statistique suffisante. Ainsi, nos précédentes études montrent que 10 souris par groupe seront nécessaires pour obtenir une étude concluante (REDUCTION). Ainsi, nous prévoyons 1326 animaux et cette estimation tient compte des différents croisements nécessaires pour obtenir les différentes mutations mais aussi des animaux d'expériences issus de ces accouplements.

Pour ces travaux il est nécessaire d'utiliser la souris, modèle animal de choix, pour étudier d'une part la physiopathologie et d'autre part l'amélioration des symptômes. Ces mesures ne peuvent pas être réalisées sur d'autres espèces évolutivement plus éloignées de l'homme car la structure du muscle est différente. De plus, la souris est physiologiquement et structurellement assez proche de l'Homme avec laquelle nous pouvons réaliser les manipulations génétiques (REMPACEMENT).

Le bien-être des animaux sera contrôlé quotidiennement et tout signe de douleur sera pris en charge en prenant les mesures appropriées en fonction du niveau de douleur observé. En cas de douleur intense, un analgésique pourra être administré et les animaux seront mis à mort prématurément pour éviter toute souffrance inutile (RAFFINEMENT).

15494 Le projet décrit l'ensemble des procédures expérimentales mises en œuvre chez le Rat dans le cadre de travaux pratiques (TP) de Pharmacologie dispensés à des étudiants de la formation à Bac+2 pour l'obtention du Diplôme Universitaire de Technologie (DUT) spécialité Génie Biologique. Ce diplôme professionnalisant a pour but de former des techniciens supérieurs, assistants ingénieurs se destinant, pour certains, à exercer dans les laboratoires de recherche dans le domaine de la santé humaine et animale.

Le contenu de l'enseignement pratique de Pharmacologie est clairement décrit dans un programme pédagogique national (PPN) publié par arrêté ministériel. Ainsi, le PPN (2013) prévoit l'apprentissage de la manipulation des animaux de laboratoire dans le respect de la réglementation et des règles de bioéthique, la maîtrise des techniques liées à l'expérimentation animale, ainsi que la mise en évidence et la quantification d'une activité pharmacologique *in vivo*. Cette formation

permet d'acquérir les bases de l'éthique et des bonnes pratiques de l'expérimentation animale (EA) selon la réglementation en vigueur.

Dans le cadre de l'enseignement de Pharmacologie, l'acquisition des compétences pratiques est progressive 1) observation du comportement du rat, apprentissage et maîtrise de divers gestes techniques (préhension, contention et injections) chez le rat vigile 2) apprentissage de quelques techniques opératoires (cathétérismes) couramment réalisées chez le rat anesthésié. L'étudiant est aussi formé aux techniques d'induction et contrôle de l'anesthésie ainsi qu'à la gestion de la douleur. Enfin, il apprendra à quantifier et interpréter les effets biologiques de diverses substances pharmacologiques *in vivo* chez le rat anesthésié.

Avant de débiter l'apprentissage pratique, un enseignement spécifique consacré au bien-être animal, au respect des règles d'éthique et à la réglementation relative à l'expérimentation animale est dispensé aux étudiants. De plus, la mise en œuvre de chaque procédure fait au préalable l'objet d'une séance d'enseignement préparatoire (3 h Travaux Dirigés – commentaires des différentes étapes pratiques à partir de photos et vidéos) pour assurer la bonne prise en charge de l'animal (réduction de l'inconfort / du stress / de la douleur) au cours de la procédure (Raffinement).

Au maximum, un total de 500 rats mâles Wistar sera nécessaire pour les 5 ans à la formation de 280 étudiants. Dans le but de respecter la règle des 3R, le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum pour être compatible avec l'exploitation des résultats expérimentaux de l'ensemble de la promotion. Ce nombre est ajusté chaque année sur la base de l'effectif de la promotion (réduction du nombre d'animaux). Le remplacement des animaux à des fins expérimentales ne peut être envisagé puisque l'expérimentation animale est prévue au programme pédagogique national. Dans un objectif de raffinement, le bien-être des animaux est contrôlé tout au long des séances de TP par l'enseignant qui choisira si nécessaire d'interrompre la procédure en cas de stress ou souffrance. Au cours des procédures sous anesthésie, les animaux reçoivent au préalable l'injection d'un analgésique (anti-douleur). L'observation d'une réduction des effets des anesthésiques conduit à une administration sans délai d'anesthésiques pour maintenir l'anesthésie à la profondeur souhaitée. L'animal est également réchauffé au cours de l'anesthésie en le plaçant sur un tapis chauffant. Les étudiants sont également très largement sensibilisés au bien-être animal et au respect des règles éthiques tout au long de l'apprentissage pratique. Enfin, les animaux sont hébergés dans une animalerie aux normes agréée par la Direction Départementale de la Protection des Populations.

15495 Contexte : Une tumeur cancéreuse est constituée de populations cellulaires hétérogènes. Les traitements actuels, à base de chimiothérapies et/ou radiothérapie, ciblent plus ou moins spécifiquement la tumeur dans son ensemble. Il apparaît que les échecs thérapeutiques sont liés à l'existence au sein de la tumeur d'une petite population cellulaire significativement plus résistante aux traitements et que cette population présente quelques caractéristiques des cellules souches (CSC). Ces cellules résistantes de type CSC ont un rôle central en cancérologie car d'une part la présence de quelques-unes de ces cellules permet de reconstituer la tumeur, et que d'autre part ces cellules sont à l'origine des métastases. Caractériser et quantifier les CSC présentes au sein d'une tumeur est donc un enjeu pronostique et thérapeutique.

Objectif : Toute cellule est caractérisée par la présence de protéines particulières à sa surface et ces protéines constituent des marqueurs. Les populations cellulaires contenant des CSC sont caractérisées par des combinaisons de marqueurs.

Au laboratoire, sur des cultures de cellules cancéreuses mammaires, nous avons caractérisé un marqueur de CSC. Ce marqueur conditionne la réponse aux traitements, dont la radiothérapie, et sa disparition en cours de traitement est un indicateur d'adaptation des cellules tumorales pour survivre. Le potentiel pronostique et thérapeutique de ce marqueur est donc intéressant s'il peut être observé sur des tumeurs.

Nous devons reproduire nos résultats dans un contexte de tumeur humaine portée par un petit animal. Le modèle de référence est la souris dont la tumeur est obtenue par injection en sous-cutané au niveau de l'abdomen de cellules cancéreuses humaines.

Les tumeurs, obtenues 1 à 3 mois après l'injection des cellules cancéreuses, sont irradiées en veillant à toucher aussi peu que possible les tissus sains adjacents.

La tumeur est irradiée à une dose modérée afin de 1/ permettre une bonne tolérance au traitement. Le fractionnement de la dose sur 3 jours, comme en clinique, améliore la tolérance et conduit à observer pas/peu d'effets secondaires, 2/ permettre une réduction significative de la taille de la tumeur, puis après 4-6 semaines une recroissance de celle-ci. Il est ainsi possible de suivre l'évolution de notre marqueur en réponse à la radiothérapie.

Cinq études seront menées séquentiellement. Dans la première, nous comparerons la croissance et la réponse tumorale à la radiothérapie de cellules dont la seule différence est l'expression ou non de notre marqueur ceci permettra de valider la pertinence de ce marqueur *in vivo*. Conditionnellement, la seconde étude fera appel à des tumeurs issues de cellules ayant une expression hétérogène de notre marqueur ceci permettra d'apprécier l'évolution du marqueur en réponse à la radiothérapie. La troisième étude, similaire à la seconde, fera appel à des fragments de tumeurs prélevés en clinique afin d'intégrer l'hétérogénéité cellulaire des tumeurs de malades (modèle PDX). Conditionnellement, deux études complémentaires. Quatre, en réponse à un stress toxique tel qu'une irradiation, des cellules considérées comme non tumorigènes génèrent une petite sous-population pour laquelle l'expression de notre marqueur est altérée, suggérant un accroissement de leur pouvoir tumorigène. Nous vérifierons cette hypothèse compte tenu de l'importance biologique/thérapeutique qui en résulte. Cinq, des nanoparticules métalliques sont décrites pour leurs propriétés radiosensibilisantes. Nous vérifierons que notre marqueur peut être utilisées comme marqueur précoce de cet effet radiosensibilisant.

Conformité à la règle des 3R

*Remplacer. : Les études *in vitro* de cultures cellulaires en 2D & 3D ont été réalisées ces dernières années et ont permis de mettre en avant un rôle important et causal de notre marqueur dans la résistance des cellules cancéreuses humaines aux chimio/radiothérapies. Il est maintenant essentiel de vérifier ces conclusions sur un modèle animal, la souris porteuse d'une tumeur de cellules cancéreuses humaines.

*Réduire. : Le nombre d'animaux inclus dans notre étude est limité au strict minimum, en particulier grâce au retour d'expérience d'études antérieures ayant caractérisé plusieurs des modèles cellulaires utilisés. Pour une des lignées de cellules cancéreuses, une étude pilote sur quelques animaux sera nécessaire pour évaluer le nombre de cellules à greffer afin d'obtenir une tumeur. Enfin, le nombre de souris par groupes est déterminé par le logiciel Sealed Enveloppe qui permet de minimiser le nombre d'animaux nécessaires pour valider un effet significatif.

Au total, pour les différentes lignées à tester, compte tenu des taux de prise de greffe des tumeurs, et des tests sur les nanoparticules, nous aurons besoin de 592 souris pour ce projet (nombre réduit si prise de greffe meilleur qu'anticipé).

*Raffiner. : En accord avec les recommandations internationales dans le domaine de la cancérologie, les souris sont suivies quotidiennement afin d'assurer leur bien-être et les expérimentations sont arrêtées avant que le volume de la tumeur puisse conduire à la souffrance des animaux et avant que l'état des animaux se dégrade, en accord avec une grille pré-établie.

Conclusion : Au cours des dernières années nous avons mis en évidence dans des modèles cellulaires *in vitro* le rôle d'un marqueur de CSC dans la réponse aux chimio/radiothérapies. L'étape suivante, ce projet, est de valider nos résultats avec des modèles animaux. En situation pré-clinique, dans des modèles de souris porteuses de tumeurs humaines en sous-cutané, il s'agit d'évaluer l'implication de notre marqueur dans la réponse à l'irradiation, tant pour les cellules sélectionnées (survivantes) par l'irradiation que pour les cellules capables d'adaptation pour survivre et générer de nouvelles tumeurs (métastases).

L'enjeu à terme est de pouvoir apprécier chez un patient, en lien avec l'expression de notre marqueur, le degré d'agressivité intrinsèque de sa tumeur et de sa réponse à un traitement.

15496 La prévalence de l'obésité s'est accrue de manière épidémique dans les pays développés. Compte tenu du lien étroit entre obésité et maladies cardiovasculaires qui représentent une des premières causes de mortalité en France, cela pose un grave problème de santé publique. Bien qu'une mauvaise alimentation et la sédentarité soient des facteurs de risque importants pour le développement des maladies cardiovasculaires, de plus en plus de données épidémiologiques et expérimentales convergent vers la même idée nos gènes se "souviennent" de l'hygiène de vie de nos parents ou en d'autres termes un désordre métabolique acquis par les parents peut être transmis via la lignée germinale paternelle et/ou maternelle à la descendance. Ainsi l'alimentation d'un individu influencerait non seulement l'expression de ses propres gènes mais également celle des gènes de sa descendance. Ce type d'hérédité est un processus nouveau mettant en jeu des mécanismes "épigénétiques" qui font appel à des modifications qui ne sont pas des mutations génétiques car elles n'affectent pas la séquence du gène. Toutefois, malgré l'importance de ces pathologies au niveau mondial, très peu de données existent concernant les mécanismes moléculaires impliqués dans ce type d'hérédité des maladies métaboliques, associées à des déséquilibres de l'alimentation. Cette étude permettra de mieux comprendre ces mécanismes moléculaires.

Ces dernières années, nous avons fait des avancées importantes dans la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans l'hérédité épigénétique en montrant d'une part qu'un stress environnemental pouvait modifier l'épigénome (ensemble des marques apposées sur le génome d'un individu et qui varient en fonction de l'organe ou du tissu, mais aussi en fonction de l'environnement : stress, alimentation) des cellules reproductrices (gamètes) et que d'autre part ces modifications pouvaient être transmises à la descendance. Malgré les retombées potentielles en termes de santé publique, on ne sait pas aujourd'hui comment le spermatozoïde transmet cette information épigénétique à la descendance. Le but du présent projet est de comprendre comment l'embryon reçoit ces modifications épigénétiques en répondant à la question suivante : le spermatozoïde transmet-il ces modifications épigénétiques par son noyau ou par des composants de son cytoplasme. Nous identifierons l'apparition de diabète ou d'obésité par des analyses moléculaires et histologiques réalisées sur des souris ayant reçu soit les composants cytoplasmiques, soit les composants nucléaires du spermatozoïde de père obèse. Le nombre de souris total utilisé pour ce projet est de 288.

Notre travail porte sur les mécanismes moléculaires impliqués dans la transmission de caractères nouvellement acquis sur un mammifère. Etant donné que les mécanismes moléculaires de ce type d'hérédité ne peuvent être analysés *in vitro*, nous sommes forcés d'utiliser un modèle murin, modèle de mammifères. Afin de calculer la taille de l'échantillon absolument nécessaire statistiquement, nous avons réalisé un calcul de puissance, test qui permet de minimiser le nombre d'animaux nécessaires pour valider ou non notre hypothèse de départ (Réduction). Nous avons ajusté le nombre d'individus à faire naître dans ce projet en fonction de nos expériences précédentes portant sur ce type d'hérédité.

Dans un souci de Raffinement, nous mettons en place toutes les dispositions permettant de minimiser les souffrances éventuelles qui pourraient être associées à nos expériences, notamment le recours à l'anesthésie. Les prélèvements de sang seront pratiqués par des personnes expérimentées.

15497 Les maladies auto-immunes représentent actuellement un problème de santé publique majeur dont la prévalence augmente dangereusement notamment à cause d'un accroissement de l'exposition à des facteurs de risques et du vieillissement des populations. Environ 3 à 5% de la population est affectée par ce type de pathologies, la maladie auto-immune de la thyroïde et le diabète de type I étant les plus fréquentes. Les manifestations cliniques de ce groupe de maladies sont très diverses et peuvent apparaître sous la forme d'épisodes aigus et/ou chroniques. Ces symptômes peuvent être localisés au niveau de certains organes (les articulations dans le cas de la polyarthrite rhumatoïde) ou être systémiques c'est à dire généralisés (pour le lupus érythémateux par exemple). Toutefois, la présence d'auto-anticorps dirigés contre des molécules du soi est une caractéristique commune à la majorité de maladies auto-immunes. L'incapacité du système immunitaire à distinguer

les molécules du soi des molécules du non-soi est due à une rupture de la tolérance et conduit au développement d'une réponse immunitaire délétère contre des composants essentiels du soi l'organisme, via son système immunitaire censé le protéger, s'attaque donc à lui-même.

Malheureusement, les immunothérapies/ traitements disponibles à l'heure actuelle reposent sur une immunosuppression globale de la réponse immunitaire, ce qui présente de nombreux effets secondaires comme une haute susceptibilité aux infections et l'apparition de cancers. De plus, ces traitements nécessitent souvent de multiples injections car ils adressent uniquement les symptômes sans soigner la cause de ces maladies. Par conséquent, le développement de nouvelles alternatives thérapeutiques plus efficaces, plus spécifiques voire ciblées, et ce sur le long terme semble crucial.

L'objectif est de rééduquer le système immunitaire du patient, par thérapie génique des cellules du système immunitaire, pour lui ré-apprendre à différencier correctement le soi du non soi et surtout à ne plus s'attaquer à ses propres cellules. Le modèle de polyarthrite rhumatoïde (PR) a été choisi pour cette étude.

Règle des 3R : Pour atteindre les objectifs de ce projet, il n'existe pas de méthode alternative reproduisant les différents mécanismes responsables de la PR n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptible d'apporter le même niveau d'information.

Le nombre de souris utilisées a été calculé comme étant nécessaire et suffisant pour pouvoir analyser statistiquement les résultats.

La PR sera induite chez les souris sauvages par injection de collagène. Les souris seront traitées par greffe de cellules génétiquement modifiées, ou « reprogrammées », l'objectif étant d'améliorer / retarder les symptômes cliniques et la pathologie PR.

Un suivi des animaux (cliniques et paramètres physiologiques) aura lieu au moins une fois par semaine (jusqu'à 4 fois par semaine lors des étapes tardives de la pathologies) afin d'évaluer le bien-être animal et d'intervenir de manière rapide et appropriée en cas de nécessité. Les points limites, associés au suivi approprié, sont adaptés au modèle PR et suffisamment prédictifs pour éviter toute souffrance animale. Les analgésiques appropriés seront utilisés tout au long de la procédure. Des aliments et de l'eau gélifiée seront déposés à différents endroits de la cage pour faciliter l'alimentation des souris.

Le nombre de souris nécessaires pour ces expériences est évalué à 2054 maximum sur 5 ans. Cependant, les expériences prévues seront réalisées de manière séquentielle afin de diminuer au possible le nombre d'animaux utilisés en tenant compte des résultats de expériences précédentes. Les manipulations seront répétées une seule fois si nécessaire pour renforcer les analyses statistiques.

15498 La Rétinopathie Pigmentaire (RP) est une maladie oculaire génétique grave qui touche environ une personne sur 3000 au niveau mondial. Cette maladie se caractérise par une perte progressive de la vision. Elle se caractérise sur le plan clinique par une perte progressive des photorécepteurs à bâtonnet suivie de la diminution de fonction des photorécepteurs à cône jusqu'à la cécité. A ce jour, même si différents mécanismes ont été décrits, aucun traitement n'a prouvé son efficacité sur le long terme. D'où l'importance d'identifier de nouveaux mécanismes et donc de nouvelles cibles thérapeutiques.

Le système S joue un rôle essentiel dans la protection contre le stress oxydant.

Nous avons démontré chez le rongeur que le système S jouait un rôle crucial dans la survie des photorécepteurs à cônes, cellules indispensables à la vision centrale et des couleurs. Il n'existe à ce jour, aucun modèle chez le primate non humain de dégénérescence des photorécepteurs à cônes. Un tel modèle est indispensable pour pouvoir tester par la suite des thérapeutiques ciblant la macula (région riche en cônes) et ainsi pouvoir envisager des traitements sur des patients atteints de rétinopathie pigmentaire.

Le but de cette étude est de bloquer le système S par injection de deux molécules inhibitrices chez le primate non humain et de montrer une altération des cellules à cônes. La structure de la rétine

sera analysée par imagerie du fond d'œil *in vivo* et la fonction rétinienne sera évaluée par électrorétinogramme. Nous procéderons par la suite à une analyse histologique de la rétine.

Pour ce projet on utilisera des primates non-humains, seule espèce ayant des propriétés anatomiques similaires à l'homme au niveau de l'œil, notamment de la rétine. Ce projet s'appuie sur des études préalables *in vitro* et chez le rongeur. Le recours à l'animal est nécessaire, car aucun milieu de culture ou système synthétique ne permet aujourd'hui de reproduire la complexité architecturale des cellules de la rétine, en particulier les interactions structurelles et fonctionnelles de ces cellules, ainsi que la réponse induite par l'administration d'inhibiteurs du système S. Le nombre d'animaux (12) a été réduit au minimum nécessaire pour obtenir des données statistiquement significatives. Chaque animal est utilisé pour l'ensemble des étapes du projet, de l'injection intraoculaire au prélèvement des tissus d'intérêt pour l'analyse. La mise en œuvre d'un suivi longitudinal non invasif (imagerie *in vivo* sur les animaux anesthésiés) minimise le nombre d'animaux utilisés ainsi que la contrainte qui leur est imposée. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions et des critères de points limites sont prévus pour prendre en compte des effets inattendus. Les actes chirurgicaux réalisés entraînant une douleur modérée, pris en charge par un traitement analgésique, une observation régulière des animaux sera faite pour détecter tout signe de détresse, et si cela est jugé nécessaire, la douleur postopératoire sera gérée par l'administration d'analgésiques. Les animaux seront hébergés en groupe, dans des conditions enrichies en favorisant les interactions sociales.

15499 L'obésité est un problème de santé publique qui atteint 13% de la population française. Cet état physiologique se définit comme une accumulation excessive de masse grasse dans l'organisme avec des conséquences néfastes sur la santé. L'obésité est la conséquence d'un excès de calories ingérées par rapport à celles dépensées, en particulier celles provenant des graisses alimentaires. Depuis peu, on sait aussi qu'elle se caractérise par une inflammation de faible intensité qui résulte notamment de modifications de la flore bactérienne intestinale (microbiote).

Ces données suggèrent qu'une meilleure connaissance des mécanismes qui contrôlent la préférence pour les graisses alimentaires, leur absorption intestinale et l'écologie bactérienne intestinale devraient permettre de mieux comprendre le rôle de l'excès de consommation de lipides dans la mise en place de l'obésité et des pathologies associées.

Un récepteur aux graisses alimentaires, le CD36, est exprimé dans presque toutes les cellules du tube digestif telles que celles constituant les papilles gustatives, celles qui absorbent les nutriments (entérocytes) et également dans les cellules immunitaires intestinales. CD36 a été montré comme participant à tous ces mécanismes il est à l'origine de la préférence pour les graisses alimentaires et facilite leur absorption intestinale. De plus il est aussi capable de détecter certaines bactéries.

C'est pourquoi, l'objectif de ce projet est de connaître la contribution du récepteur CD36 oro-intestinal dans la mise en place de l'obésité liée à une surconsommation de lipides alimentaires

Pour répondre à cet objectif nous utiliserons un modèle de souris transgéniques déficientes en CD36 (Knock-Out CD36 appelées aussi CD36 (-/-) ainsi que des souris de type sauvage issus de la même portée. Ces souris appartiennent au fond génétique C57BL6/J et seront nourries avec un régime standard ou riche en graisses (lipides) et seront comparées à des souris sauvages (contrôles) soumises aux mêmes régimes pendant 6 semaines. Nous prévoyons l'utilisation de 176 souris (10 semaines au début des procédures) au total avec 50% de mâles et 50% de femelles afin d'évaluer les différences liées au sexe. Nous évaluerons l'évolution de la masse grasse, de la dépense énergétique, de la préférence pour le gras, des capacités d'absorption intestinale des lipides, de l'inflammation et du microbiote intestinal, au cours du temps.

Ce projet est en adéquation avec la règle des 3R Le remplacement est impossible car il s'agit d'étudier des processus physiologiques mettant en jeu plusieurs organes (langue, intestin, système immunitaire et tissu adipeux). Il est donc indispensable de recourir au modèle animal pour une approche intégrée. Le nombre total d'animaux a été réduit à 176, minimum requis pour assurer la fiabilité des analyses statistiques. En ce qui concerne le raffinement, les animaux seront hébergés dans des conditions optimales avec un enrichissement de leur milieu adapté. Ils bénéficieront d'un

suivi quotidien de leur état général. Lors des procédures expérimentales, les actes susceptibles d'entraîner une souffrance ou une douleur (c'est à dire uniquement les prélèvements de sang en retro-orbital), seront réalisés sous anesthésie générale (anesthésies flash à l'isoflurane), par des personnes expérimentées, en surveillant le maintien de la température corporelle grâce à une table chauffante.

S'agissant d'un projet nécessitant l'utilisation d'animaux vivants, l'utilisation de techniques non invasives et indolores ainsi que de tests comportementaux est privilégiée afin d'acquérir les paramètres physiologiques nécessaires au projet tout en respectant les questions d'éthiques en expérimentation animale et la règle des 3R. De plus, des points limites en adéquation avec ce projet ont été définis (signes généraux de souffrance, perte de poids supérieure à 20% en quelques jours, prise de poids pouvant gêner la locomotion). En cas d'atteinte d'un de ces points limites, l'animal concerné sera retiré du projet. Enfin, un nombre restreint d'expérimentateurs disposant d'une formation et d'une qualification adéquate à l'expérimentation animale interviendra dans ce projet.

15500 Les informations sensorielles sont transmises des sens au cerveau en permanence. Celui-ci analyse, trie et affine ces informations pour former une perception stable et globale du monde qui nous entoure. Ce processus de traitement implique de nombreuses décisions perceptuelles en continu (quelle est cette forme, cette sensation tactile, ce son ?) qui guident nos interactions avec l'environnement.

Ainsi, ces décisions sensorielles que prend le cerveau sont parfois considérées comme l'une des bases de la cognition. Ce traitement et les prises de décision associées sont toutefois basés sur un réseau complexe distribué dans l'ensemble du cerveau.

L'objectif global de notre équipe est de comprendre l'interaction des signaux provenant de zones fonctionnelles interconnectées dans le néocortex. Notamment, notre compréhension de l'interaction entre les zones corticales des deux hémisphères cérébraux reste superficielle. De plus, il y a un manque de connaissances précises sur les corrélats neuronaux du comportement décisionnel, dans les cortex sensoriels. Dans cette optique il faut aussi étudier les zones corticales responsables de stratégies décisionnelles complexes, dont les cortex pariétal et préfrontal sont les principaux acteurs.

Le bénéfice principal attendu de ces études est une meilleure compréhension du traitement cortical de l'information. Les connaissances ainsi acquises contribueront non seulement à la recherche fondamentale sur les processus sensoriels, mais aussi à une meilleure compréhension des troubles pathologiques. Un premier exemple est la recherche sur les stratégies de stimulation efficaces qui sont utilisées pour les neuroprothèses (e.g. implants cochléaires) corticales. Un autre exemple est la description des réseaux neuronaux entre les régions cérébrales principalement sensorielles et super ordonnées (pariétales et préfrontales) impliquées dans les troubles perceptuels et cognitifs chez les patients schizophrènes.

Ce projet prévoit d'aborder ces questions en analysant le comportement de prise de décision des animaux dans des tâches spécifiques tout en enregistrant et en manipulant directement l'activité de leurs neurones corticaux.

Pour cela nous utiliserons des techniques de microscopie biphotonique, d'imagerie à champ large, d'électrophysiologie et d'optophysiology. Les trois premières méthodes permettent d'étudier différents aspects de la coordination entre des réseaux corticaux proches ou éloignés. Les deux dernières techniques permettent la stimulation d'un ou plusieurs neurones afin d'influencer la perception de l'animal et de recueillir ainsi de précieuses informations sur la fonction de ces neurones dans les processus décisionnels.

Pour étudier un phénomène complexe comme la prise de décision, le recours à l'animal est indispensable car le manque de résolution spatiale et temporelle des techniques typiquement utilisées chez l'humain (Electroencéphalogramme EEG, imagerie par résonance magnétique fonctionnelle fMRI) rend impossible leur utilisation et la nature invasive des techniques alternatives interdit leur utilisation chez l'homme. Par ailleurs les techniques *in vitro*, sur cellules, ne permettent pas non plus d'explorer ce phénomène.

La structure générale du cortex murin est proche de celle de l'humain, mais sa petite taille présente notamment l'avantage de permettre d'observer simultanément un large pan du néocortex. Par ailleurs, les rongeurs (souris et rats) (âge minimum 6 semaines, sexe de préférence mâle) sont particulièrement adaptés à ce projet en raison de leurs capacités cognitives et de leur capacité à coopérer dans des expériences comportementales, en échange de récompenses. Les données ainsi collectées permettront de créer des modèles informatiques du cerveau et de diminuer ainsi dans le futur l'utilisation de modèles animaux.

2349 rongeurs (souris ou rats) seront utilisés sur 5 ans. Ce nombre d'animaux, à la fois nécessaire et suffisant pour étudier les questions posées, a été établi en adoptant des taux d'erreur usuels pour ce type d'étude statistique et en estimant la taille des effets obtenus à partir d'études précédentes comparables. Si moins d'animaux que prévu étaient nécessaires pour ce projet (rendement expérimental supérieur à la moyenne, effet forts,), seuls les animaux strictement requis seraient utilisés

La procédure d'enregistrement nécessite au préalable une chirurgie, sous anesthésie et administration d'analgésique, pour l'implantation d'un dispositif d'enregistrement. Celle-ci est effectuée sous anesthésie générale et analgésie afin de prévenir le stress et la douleur. Chaque animal sera surveillé régulièrement pour assurer sa bonne santé, de son entrée à l'animalerie en hébergement et pendant toute la période d'expérimentation à sa mise à mort. Une surveillance accentuée sera effectuée post-chirurgie. Les animaux montrant des signes de douleur recevront des analgésiques et les infections éventuelles seront traitées par antibiotiques. Des points limites ont été définis, et s'ils sont atteints, les animaux seront mis à mort. En revanche, l'enregistrement de données est non invasif et les tâches comportementales reposent sur la coopération de l'animal. Ceux-ci sont donc progressivement habitués à l'environnement de travail et leur comportement détermine toujours la durée de la séance d'entraînement, de sorte que les enregistrements n'ont lieu que si l'animal se sent à l'aise et coopère. Les 2 procédures qui constituent ce projet sont donc de sévérité modérée.

15501 La mortalité liée au tabagisme est de 100 millions de morts au 20ème siècle. Si les risques de développer des problèmes de type atteintes cardiovasculaires, bronchiques mais aussi et surtout des cancers sont bien connus, d'autres sur-risques ont été identifiés ces dernières années. Ainsi, les effets systémiques de la fumée de cigarette comme l'inhalation des composants particuliers de cette fumée, représentent un facteur majeur d'irritation et d'inflammation directe des voies respiratoires. Et donc le tabagisme constitue un facteur de sur-risque de complications respiratoires, cardiovasculaires, cicatricielles, infectieuses dans la période post-opératoires. Cette inflammation est considérablement diminuée par un sevrage même bref, de quelques jours. Ce sevrage reste néanmoins illusoire en pratique, dans le contexte d'une intervention facteur d'anxiété et d'un sujet souvent fortement dépendant de la nicotine, alors qu'il faudrait dans l'idéal un sevrage pré-opératoire de deux semaines au moins pour éviter ce sur-risque. C'est pourquoi l'utilisation de substituts de la nicotine pourraient être proposés.

En France 28,2% des 15-75 ans sont des fumeurs quotidiens. En 2014, 31% d'entre eux ont tenté d'arrêter la cigarette. C'est 4 millions de Français qui recherchent une solution efficace pour se libérer du tabac et des problèmes de santé qu'il entraîne. Plusieurs méthodes de substitution de la nicotine existent mais dans la littérature scientifique, elles n'ont pas toutes la même efficacité. Par exemple, le New England Journal publie une étude évaluant l'efficacité des méthodes de substitution de la nicotine dans une population de sujets souhaitant arrêter le tabac. Cette étude montre que 18% de sujets utilisant la cigarette électronique ont arrêté le tabac en 1 an, alors que seul 9% de sujets ont arrêté le tabac après 1 an en utilisant d'autres systèmes de substitution de la nicotine.

L'e-cigarette est donc un espoir pour les professionnels de santé et les usagers qui se sont rapidement emparés de cet outil pour réduire la consommation de tabac, et donc diminuer les risques liés à son usage. Par ailleurs, comme de nombreuses études ont montré l'intérêt du sevrage tabagique pré-opératoire, même peu de temps avant une opération, la cigarette électronique pourra

être proposée comme substitut de la nicotine en période pré-opératoire à la condition que ces systèmes soient reconnus pour avoir un rapport bénéfice/risque positif.

Cette solution transitoire est un compromis pour le sujet en addiction forte à la nicotine, ne pouvant ou ne souhaitant pas arrêter de fumer avant une intervention ou devant bénéficier d'une opération dans un délai bref. Par ailleurs, une substitution du tabac ne peut se faire que par un dispositif assurant une biodisponibilité et une cinétique d'absorption équivalentes à la nicotine délivrée par la cigarette classique mais sans apporter les inconvénients propres à l'inhalation de fumée. De plus, si nous souhaitons inclure ces systèmes dans une prise en charge de patients leur absence de toxicité pulmonaire, au moins aigue, doit être démontrée.

Aujourd'hui, les dispositifs comme la cigarette électronique pourraient être des substitutifs du tabac de choix en période pré-opératoire. La température qui chauffe l'e-liquide est basse et limite la production de produits nocifs issus de la combustion, le sujet inhale de la vapeur et non plus de la fumée. Les e-cigarettes apparaissent sous formes variées sur le marché avec déjà des dispositifs de 2e et 3e génération mais surtout de nouveaux dispositifs utilisant la pyrolyse du tabac ou des sels de nicotine. Ces systèmes n'étant pas des dispositifs de santé, ils n'ont pas été testés lors d'essais cliniques et il n'y a que peu de données disponibles quant à leur impact sur la santé humaine, notamment à long terme. Par ailleurs, la pharmacocinétique de la nicotine et de son principal métabolite, la cotinine, est peu connue après vapotage et en fonction du type de système électronique vapoté.

Une étude clinique débutée en 2019 a pour objectif de caractériser la pharmacocinétique de la nicotine après vapotage ainsi que d'identifier les molécules exhalées par le vapoteur avant et après vapotage de manière à objectiver un possible impact du vapotage sur le système respiratoire humain. Cependant, la réalisation d'une étude sur modèle animal permettra d'aller plus loin dans la compréhension des phénomènes d'absorption et de biodisponibilité des molécules vapotées dans l'organisme. La possibilité d'étudier les organes impliqués dans l'absorption, le métabolisme et l'élimination de la nicotine permettra également d'objectiver plus facilement une éventuelle toxicité d'organe(s) après utilisation de ces produits.

Pour ce projet, un maximum de 20 porcs sera testé dans le respect de la règle des 3 Rs

Remplacement Les études *in vitro* comme les cultures cellulaires exposées à la vapeur de cigarette électroniques donnent des résultats difficilement transposables à l'homme. Des tests chez l'animal puis chez l'homme restent importants à réaliser. Nous avons choisi le porc comme modèle car c'est l'animal qui a les systèmes respiratoire et cardio-vasculaire les plus proches de l'homme. Par ailleurs, ce modèle permet de réaliser des prélèvements sanguins et tissulaires qui ne sont pas réalisables chez l'homme en raison des préjudices possibles pour le sujet.

Réduction L'étude en « cross-over » permet que l'animal testé soit son propre témoin. Cela limite le nombre d'animaux tout en permettant d'obtenir des données exploitables. Après chaque groupe de 2 animaux une analyse statistique nous donnera un stop ou go. En cas de résultats statistiquement significatifs l'étude s'arrêtera avant l'utilisation du total d'animaux prévus.

Raffinement les animaux sont maintenus en groupes sociaux dans des box aux normes européennes, ils disposent d'enrichissements comme des balles, des objets à mâchouiller, une aire de repos et une musique d'ambiance qui couvre les bruits aversifs. Une surveillance quotidienne est assurée par du personnel qualifié. L'expérimentation est réalisée sous anesthésie générale et avec gestion de la douleur, les animaux sont euthanasiés sous anesthésie profonde, sans réveil en fin de procédure.

15502 La maladie de Chagas, ou trypanosomiase américaine, est une maladie chronique négligée, causée par le parasite *Trypanosoma cruzi*. Elle est majoritairement transmise par les réduves, des insectes hématophages, mais aussi par voie congénitale, par transfusion de sang, par transplantation d'organe, ou par ingestion d'aliments contaminés. Elle sévit essentiellement en Amérique latine, où on recense plus de 10 millions d'individus infectés. Des cas se sont déclarés récemment dans d'autres pays, dont plusieurs pays européens, aux Etats-Unis, au Canada, Japon, Australie. Parmi les individus infectés, sur le long terme et parfois plusieurs dizaines d'années après leur infestation,

30 à 40% développent des problèmes cardiaques ou digestifs pouvant être fatals, causant environ 10 600 morts par an. Il existe des traitements antiparasitaires, mais ils présentent des effets secondaires et ne sont efficaces que s'ils sont administrés au début de l'infestation. Cette première phase de la maladie étant souvent silencieuse, la majorité des patients est diagnostiquée trop tard pour bénéficier de ces traitements. Dans un tel contexte, un vaccin serait le moyen le plus efficace de prévenir cette maladie.

Un candidat vaccin à visée préventive et thérapeutique est développé au sein du consortium international financé par l'Union Européenne. Il est aujourd'hui impossible de reproduire la complexité d'une réponse immunitaire au niveau de l'organisme entier par un modèle *in vitro*. Le recours à un modèle animal est donc nécessaire. Ce candidat a déjà montré son efficacité chez la souris. Le macaque, génétiquement et physiologiquement proche de l'humain, permet l'étude de la réponse vaccinale à *T. cruzi* dans un contexte pertinent. Afin d'évaluer l'efficacité du candidat vaccin dans ce modèle, une étude du candidat vaccin chez le Primate Non Humain (PNH) fait l'objet d'une autre demande d'autorisation de projet. En raison de la sensibilité de *T. cruzi* à la congélation et de la perte graduelle du pouvoir infectieux des parasites cultivés *in vitro*, les parasites utilisés pour l'inoculation des PNH seront produits *in vivo*.

L'objectif de ce projet est donc de produire *in vivo* chez la souris les parasites qui seront utilisés pour l'inoculation des PNH. Au maximum 1 146 souris nées et élevées à des fins scientifiques dans des élevages agréés seront incluses dans ce projet, d'une durée de 5 ans (soit une moyenne d'environ 229 souris par an). Les souris seront hébergées en groupe dans des cages agrémentées de modules permettant de varier leurs activités. Les méthodes expérimentales (inoculation, prélèvements sanguins) ont été définies de manière à éviter toute souffrance (limitation des fréquences de prélèvement et des volumes sanguins prélevés, exposition au pathogène réalisée sous anesthésie générale). Si la production de parasite est supérieure à celle attendue, nous pourrions revoir à la baisse le nombre d'animaux à utiliser dans les procédures suivantes. Afin d'éviter toute souffrance, les animaux seront euthanasiés peu après infection, avant l'apparition de symptômes et de mortalité. De plus, des critères d'arrêt sont prévus afin de prendre en compte, le cas échéant, la progression de la maladie et d'autres éventuels effets inattendus. En cas d'apparition de tels effets, les vétérinaires de l'installation seront alertés et mettront en œuvre des traitements appropriés.

15503 L'atrophie multisystématisée (AMS) est une maladie neurodégénérative rare et de cause inconnue touchant plus de 3000 personnes en France. L'AMS se traduit par un syndrome parkinsonien et des troubles de la coordination, conduisant à une grave invalidité motrice, ainsi que des troubles respiratoires, cardiovasculaires et urogénitaux. L'espérance de vie moyenne après la déclaration de l'AMS est inférieure à 9 ans et il n'existe à l'heure actuelle, aucun traitement disponible pour atténuer la sévérité des symptômes ou la progression de cette maladie dévastatrice. L'AMS se caractérise par la présence d'inclusions cytoplasmiques contenant la protéine alpha-synucléine (SYN) agrégée dans les oligodendrocytes. Selon plusieurs données expérimentales, l'agrégation de la SYN serait à l'origine des déficits moteurs et du processus neurodégénératif de l'AMS.

Du fait de la gravité, de la rapidité et de la généralisation du processus neurodégénératif, le développement de traitements neuroprotecteurs capables de ralentir l'évolution de la maladie constitue un besoin urgent. L'accumulation de la SYN résulte d'un processus d'agrégation de molécules anormalement repliées de SYN.

Des travaux ont récemment mis en évidence l'effet anti-agrégation d'une molécule appelée SynuClean-D. *In vitro*, cette molécule permet de diminuer de 70% l'agrégation de SYN et est efficace sur différentes souches de SYN. Sur culture primaire, en plus d'une réduction des agrégats de SYN, il n'a pas été mis en évidence de toxicité neuronale. *In vivo*, l'efficacité de cette molécule a été mise en évidence dans deux modèles transgéniques de synucléinopathie chez le ver *C. Elegans*.

Du fait d'une faible pénétration cérébrale de SynuClean-D, plusieurs analogues de la molécule sont en cours d'évaluation afin de valider celui dont l'efficacité *in vitro* et la pénétrance cérébrale chez la

souris C57Bl6 seront les plus optimales. Après cette validation préalable, la molécule choisie sera testée par notre équipe sur un modèle murin d'AMS.

Afin de respecter la règle des 3R, les études préalables à ce projet ont pour objectif de sélectionner la molécule la plus adaptée à l'étude *in vivo* (toxicité, potentiel effet bénéfique) et ainsi de Réduire le nombre d'animaux utilisés pour l'expérimentation par la sélection et l'optimisation d'une seule molécule à tester chez l'animal.

Pour le respect du R de raffiner, les procédures prévues sont légères. Nous avons vérifié par ailleurs qu'aucune donnée actuelle n'indique que les molécules testées ne soient susceptibles d'entraîner une souffrance chez les animaux. Les expérimentateurs formés porteront une attention particulière au raffinement des procédures afin de limiter la douleur, la soulager si elle ne peut être évitée par l'utilisation d'antalgiques les plus adaptés à chaque procédure, optimiser les procédures, limiter le stress des animaux et leur fournir les meilleures conditions de vie tout au long du projet. Pour leur bien-être, les animaux vivent en groupes sociaux et ont à leur disposition des éléments d'enrichissement de leur milieu. L'ensemble des animaux est surveillé quotidiennement. Des points limites suffisamment précoces seront définis pour éviter des souffrances aux animaux avec la mise en place de mesures pour les soulager comme une réhydratation, un réchauffement, une nourriture adaptée et des traitements vétérinaires si nécessaire. Les tests comportementaux réalisés feront appel au comportement moteur spontané de l'animal sans contention. Le bien-être des animaux sera pris en compte à chaque étape.

L'étude *in vivo* d'une molécule dans le traitement de l'AMS est une étape indispensable qui ne peut être Remplacée par des travaux *in vitro/ex vivo*.

Nous avons sélectionné un nombre de 12 animaux par groupe permettant d'obtenir la puissance nécessaire à la question de l'étude. Nous débuterons l'étude sur des animaux de 8 semaines, avant l'installation des pertes des neurones, afin de rechercher un ralentissement du processus. Si ces résultats sont concluants, nous pourrions reproduire le schéma thérapeutique sur des animaux de 12 semaines afin de se placer dans une fenêtre où la perte neuronale est déjà installée, ce qui correspond à la situation clinique des patients actuellement au moment du diagnostic. Ainsi 96 animaux seront utilisés dans ce projet.

15504 Les antibiotiques ont révolutionné la prise en charge des infections bactériennes. Toutefois, l'augmentation de leur consommation a été de concert avec l'expansion des résistances bactériennes et présage à des impasses thérapeutiques imminentes. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) s'alertait en octobre 2016 de la grave menace de « l'ère post-antibiotiques », et la nécessité absolue de trouver des alternatives thérapeutiques.

On note par exemple que la proportion d'entérobactéries résistantes aux carbapénèmes (antibiotiques de derniers recours) est devenue préoccupante en Europe. Certes, le taux de résistance des entérobactéries est encore assez faible en France (jusqu'à 0,7% en 2015) mais est plus forte en Europe de l'Est (10%) et notamment en Grèce (jusqu'à 60% de résistance). En outre, ces infections évoluent par « épidémie » et ont un impact majeur sur l'organisation d'un hôpital (isolement, mesures de cohorting...). Cette augmentation de résistance est majoritairement attribuable à la production de carbapénémase de type OXA-48 par les bactéries.

Les entérobactéries sont les principales responsables des infections urinaires (IU), qui sont elles-mêmes parmi les infections bactériennes humaines les plus fréquentes. Les IU touchent principalement les femmes, pour des raisons anatomiques. Aujourd'hui, plusieurs équipes travaillent au développement d'alternatives aux antibiotiques dans les IU. Par exemple, il a été rapporté que l'utilisation de mannosides comme leurre moléculaire permettait de traiter les IU basses à *Escherichia coli*. Cependant, les mannosides sont uniquement reconnus par les pili de type 1, permettant la fixation à l'urothélium, leur efficacité étant alors limitée en cas d'IU haute atteignant les reins, car les adhésines en jeu diffèrent.

L'utilisation de bactériophages (virus infectant uniquement les bactéries) pourrait permettre d'éradiquer le pathogène multirésistant aux antibiotiques responsables de l'IU en cours. En effet, les bactériophages sont capables d'infecter spécifiquement une espèce bactérienne. Ainsi, ils

pourraient être utilisés dans le traitement des IU à *E. coli* et, ce traitement pourrait être adapté aux IU causées par d'autres entérobactéries comme *Klebsiella pneumoniae* ou *Enterobacter cloacae*, en utilisant des phages ayant une spécificité pour ces espèces bactériennes.

Par ailleurs, il a déjà été montré que le traitement par instillation intravésicale de bactériophages permettait de réduire la présence de *Chronobacter* dans les voies urinaires infectées chez la souris. Il a également été montré que les bactériophages pouvaient réduire la quantité d'*E. coli* uropathogène (UPEC) adhérent à l'urothélium humain *in vitro* et qu'ils possédaient une activité anti-biofilm contre *Proteus mirabilis* (entérobactérie) dans le cadre d'IU associées aux cathéters. Plus précisément, la phagothérapie pourrait être une solution dans le cas d'infections sévères de l'appareil urinaire, et dont l'antibiogramme montrerait l'implication d'une bactérie multirésistante aux antibiotiques.

Notre objectif de travail est de tester l'efficacité de la phagothérapie dans le traitement des infections urinaires hautes causées par les souches d'entérobactéries multirésistantes aux antibiotiques (productrices de carbapénèmases ou de bêta-lactamases à spectre étendu), souche d'*E. coli*, dans un modèle murin. Pour cela, nous effectuerons des instillations intravésicales de bactériophages préalablement sélectionnés par des tests *in vitro*. Le traitement de phagothérapie pourra être utilisé en association avec un antibiotique afin de tester la synergie des deux thérapeutiques. Nous utiliserons 668 souris SWISS femelles de 6 semaines de vie. Cette étude sera menée en appliquant la règle des 3R.

- Réduire le nombre de souris a été réduit au minimum afin de garder une analyse statistique fiable. Pour les comparaisons intergroupes, un minimum de 12 animaux par groupes est nécessaire sur le plan statistique afin de valider les résultats. C'est pour cela que nous avons choisi d'utiliser ce minimum d'animaux par groupe, à savoir 12.

- Raffiner en cas de souffrance, les souris seront euthanasiées selon une procédure appropriée (dislocation cervicale sous anesthésie). Afin de réduire au maximum l'inconfort voire la douleur que la procédure de cathétérisation intra-urétrale peut engendrer, celle-ci sera faite sous anesthésie générale par isoflurane (gaz anesthésiant). Suite à cette manipulation, les souris seront surveillées pendant une heure afin de s'assurer de l'absence de complications. Les prélèvements d'organes seront faits après euthanasie des animaux.

- Remplacer l'expérimentation *in vivo* a déjà montré comme donnant des résultats très différents de l'expérimentation *in vitro*. Or, il est nécessaire d'obtenir des informations sur un organisme vivant. Enfin, le bien-être des animaux est monitoré tout au long de l'étude.

15505 L'obésité est l'une des principales causes de morbidité dans les pays industrialisés et un enjeu grandissant de santé publique. Selon les calculs de l'OMS, cette pathologie touchait 650 millions de personnes en 2016. Son degré de sévérité est à la fois associé à une composante génétique, à une diminution de l'activité physique mais aussi à des modifications des habitudes alimentaires. Actuellement, les traitements les plus efficaces, sur le long terme, restent les chirurgies gastriques. Comme ces techniques sont très invasives, d'autres méthodes sont actuellement en cours d'étude comme la prise d'hormones régulant la satiété et la prise alimentaire telle que l'amyline. L'utilisation de cette hormone ou de dérivés synthétiques donne des résultats encourageants dans plusieurs tests cliniques et précliniques. Cependant les mécanismes moléculaires associés sont mal connus tout comme son mode d'activation. L'étude physiologique de son expression chez des individus résistants ou sensibles à un régime hypercalorique permettra de recueillir des connaissances supplémentaires et essentielles à la validation thérapeutique de l'amyline, mais aussi de mettre au point des stratégies pour limiter les effets secondaires associés à son utilisation.

L'objectif de cette procédure est d'établir deux lignées de rats, l'une résistante et l'autre sensible à un régime hypercalorique. Pour ce faire, et après une période d'acclimatation, nous alimenterons pendant trois semaines des rats avec une diète hypercalorique. Afin de contrôler l'efficacité du régime et de veiller au bien-être des animaux, nous suivrons l'évolution de leur statut pondéral et mesurerons leur prise alimentaire. Des mesures biochimiques seront aussi réalisées grâce à un prélèvement sanguin pratiqué à la fin de la diète. Ces mesures nous permettront d'identifier et

d'isoler deux groupes d'animaux les rats les plus lourds et les plus légers. Les animaux d'un même groupe seront ensuite accouplés entre eux. Leur descendance sera similairement traitée et sélectionnée afin d'établir, au bout de quatre générations deux lignées distinctes de rats une lignée résistante et une lignée sensible au régime hypercalorique. Les modèles ainsi obtenus pourront ensuite être utilisés pour approfondir l'étude du rôle de l'amyline dans le traitement de l'obésité.

Dans la littérature, des données obtenues grâce à des systèmes de cultures cellulaires sont disponibles sur l'amyline. Toutefois, aucune de ces alternatives *in vitro* ne permet d'inclure l'analyse des échanges entre les différents types cellulaires et les organes d'un organisme vivant et de rendre compte des effets/conséquences physiologiques d'un régime hypercalorique. Le recours aux modèles murins est donc indispensable à cette étude et pourra mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques.

Dans le cadre de ce projet, et pour satisfaire au raffinement, l'hébergement des animaux sera réalisé dans des locaux appropriés au sein de notre structure agréée, avec un enrichissement systématique des cages (bâtons de bois à ronger et matériel de nidification). Un personnel habilité réalisera les différentes procédures en respectant les règles d'éthiques, le bien-être animal et le principe des 3R. Les points limites seront observés tout au long du projet. Une surveillance des animaux sera réalisée quotidiennement pour détecter et traiter tout signe de douleur éventuel. Tout animal qui présenterait une perte d'état général sévère sera euthanasié selon une méthode recommandée par la réglementation et approuvée par le comité d'éthique et la Structure Bien-être Animal. Les animaux seront au maximum hébergés en groupe afin de respecter et garantir leur bien-être. Toutefois afin d'assurer un accès ad libitum à la nourriture pour chaque individu, en dehors de tout effet de dominance et de compétition qui pourrait entraîner un biais dans la sélection des animaux et avoir un impact négatif sur notre projet, les rats seront isolés de la mise en régime jusqu'à leur accouplement. Cette période d'individualisation qui nous permettra aussi de suivre la prise alimentaire des animaux, sera précédée d'une période d'acclimatation avant la mise en place du régime hypercalorique.

Pour la mise en place des différents lots requis pour cette étude, nous estimons qu'au total 1300 rats seront hébergés et générés. Le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum requis pour atteindre l'objectif scientifique fixé en respect des principes de remplacement, de réduction et de raffinement. Le nombre d'animaux par lot pour les études a été calculé de manière à obtenir le minimum d'animaux par groupe pour pouvoir établir les lignées nécessaires à la poursuite du projet de recherche.

15506 Le 31 décembre 2019, plusieurs cas de pneumonies furent recensés chez des personnes ayant été exposées à des animaux sur le marché de fruits de mer de Wuhan (Chine). Le SARS-CoV2, proche du coronavirus du syndrome respiratoire aiguë sévère (SARS-CoV), a été identifié comme l'agent étiologique. L'infection par SARS-CoV2 se caractérise par une période d'incubation plus longue (jusqu'à 14 jours) associée à une excrétion virale importante dès les premiers jours (y compris en absence de symptômes). Plus de 1 200 000 personnes infectées ont à ce jour été confirmées à travers le monde, poussant l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) à qualifier le COVID-19 de pandémie et d'urgence de santé publique de portée internationale.

Alors que les cas sévères de COVID-19 semblent à ce jour être majoritairement représentés par les personnes âgées ou personnes présentant des comorbidités (diabète, pathologies chroniques), peu d'informations sont disponibles sur la biologie de l'infection SARS-CoV2, permettant de mieux comprendre et caractériser les facteurs facilitant ou empêchant l'infection chez l'hôte.

Au cours d'une infection virale, la réponse immunitaire est rapidement mise en place afin d'éliminer le virus de l'organisme. La réponse interféron (IFN) constitue la première ligne de défense de cette réponse immunitaire, au cours de laquelle de nombreuses molécules antivirales sont produites en quantités importantes afin de limiter la multiplication et la dissémination du virus au sein de l'organisme. Parmi ces molécules, les protéines IFITMs ont été démontrées comme inhibant la réplication de nombreux virus dont le VIH, le virus Zika (ZIKV), les virus grippaux, ou encore les coronavirus SARS-CoV et MERS-CoV.

Dans un premier axe, nous allons nous concentrer sur l'impact des protéines IFITMs dans la modulation de l'infection par SARS-CoV2. La première procédure de cette étude, nécessitant l'utilisation de 240 souris, consistera ainsi à étudier l'efficacité et la pathogénicité de l'infection SARS-CoV2 chez des souris exprimant ou non les protéines IFITMs.

Avant la pandémie de COVID-19, une autre urgence de santé publique de portée internationale fut décrétée par l'OMS en 2016 lors de l'épidémie à infection Zika en Amérique Latine. De façon remarquable, la transmission transplacentaire de ZIKV de la mère au fœtus fût associée à des désordres neurologiques et ophtalmologiques du fœtus. Aujourd'hui, il a été établi que la réponse IFN, et plus spécifiquement les protéines IFITMs, pouvaient être à l'origine de dommages architecturaux du placenta en entravant la mise en place de la barrière placentaire, empêchant inéluctablement le développement du fœtus et provoquant des résorptions fœtales.

L'objectif de ce second axe est ainsi d'étudier le rôle de la réponse interféron et des protéines IFITMs dans la survenue des dommages du placenta et du fœtus chez les femmes infectées par ZIKV.

Nous envisageons ainsi d'investiguer dans une seconde procédure (800 souris) si les résorptions fœtales dépendantes d'IFITM sont observées dans le cas de l'infection maternelle par ZIKV. Dans la même procédure, l'effet de la réponse IFN suite à une autre infection virale (virus du Chikungunya) ou à une infection bactérienne (*Listeria monocytogenes*) sera également explorée. Nous allons ensuite étudier le rôle des protéines IFITMs dans l'efficacité de l'infection ZIKV chez les souris adultes mâles et femelles (240 souris), ainsi que dans la pathogénicité virale chez la dyade mère-fœtus en utilisant des souris femelles adultes et gestantes (180 souris). Enfin, dans une cinquième procédure (120 souris), nous étudierons l'effet d'une drogue approuvée cliniquement, l'amphotéricine B, sur sa capacité à limiter l'effet des protéines IFITM et restaurer un état non pathologique chez des souris femelles adultes gestantes infectées par ZIKV.

Bien que chacune des procédures de ce projet puisse occasionner quelques effets néfastes pour les animaux dus aux infections virales et bactériennes (perte de poids, tremblements, isolement), chaque animal fera l'objet d'une surveillance attentive et régulière dans le but de minimiser toute douleur et/ou souffrance et d'optimiser le bien-être animal, ce qui permettra de limiter la sévérité de chaque procédure à un degré modéré. Des points limites ont été mis en place de manière à mettre à mort au plus tôt tout animal qui les atteint. Pour toutes les procédures décrites, les souris seront hébergées en groupe dans une litière appropriée enrichie de matériaux de nidification, et seront maintenues dans un environnement stérile et protégé pour réduire le risque de (sur)infection naturelle et accidentelle.

Une étude statistique a été réalisée afin de calculer le nombre d'animaux requis pour obtenir une conclusion scientifique satisfaisante à cette étude. Ainsi, la réduction à 5 animaux par groupe permet de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés au cours de cette étude tout en assurant un nombre suffisant pour permettre d'émettre des conclusions sur les résultats obtenus. Des travaux parallèles réalisés *in vitro* permettent également d'orienter les pistes de recherche afin de limiter le nombre d'animaux utilisés pour les expériences ne pouvant être réalisées autrement. A terme, cette étude devrait aboutir à une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans l'entrée virale de SARS-CoV2 chez son hôte ainsi que le développement de syndromes congénitaux liés à Zika, et pourrait offrir de nouvelles perspectives de traitement.

15507 Les représentations de la valeur guident les choix quotidiens. Confronté à une décision entre deux actions, nous, et les autres animaux, choisissons généralement l'action qui produit l'effet le plus précieux. Un tel comportement est défini comme « dirigé vers un but ». Ce comportement nous permet d'intégrer notre connaissance des relations entre les événements de l'environnement avec nos besoins et nos désirs actuels afin de sélectionner la réponse appropriée. Notre compréhension de la prise de décision a été considérablement améliorée en étudiant le comportement dirigé vers un but. Mais il y a une exception notable. Ce domaine a largement ignoré l'influence du contexte environnemental sur les décisions. Ce projet utilise un modèle de comportement dirigé vers un but chez le Rat (455 rats, Long Evans) afin d'étudier les bases neurocognitives du contrôle contextuel du choix. Ce projet élargit le cadre théorique de l'étude du comportement de choix et contribuera

au développement de modèles computationnels et biologiques de la prise de décision. Une meilleure compréhension du contrôle contextuel du choix ouvrira en outre des perspectives de recherche translationnelle vers des troubles neuropsychiatriques impliquant des déficits dans la prise de décision.

Ce projet testera l'hypothèse selon laquelle le contrôle contextuel du choix nécessite des interactions dynamiques entre l'amygdale, le cortex préfrontal, le striatum et l'hippocampe. Quatre approches complémentaires sont planifiées. D'abord une approche d'anatomie descriptive est nécessaire pour raffiner les interventions qui seront employées dans le projet et consiste à identifier les connexions nerveuses qui existent entre les neurones corticaux, amygdales, striataux et hippocampal. Ensuite une approche lésionnelle permettra initialement de valider une épreuve comportementale visant à solliciter la capacité à faire un choix adaptatif. Puis des approches pharmacogénétiques et optogénétiques complémentaires permettront de comprendre le rôle des différentes voies anatomiques identifiées dans l'approche descriptive dans ces processus. En utilisant ces approches, nous inhiberons la communication entre ces régions, soit par une substance pharmacologique (approche pharmacogénétique), soit par une stimulation lumineuse au niveau intracrânien (approche optogénétique), afin de déterminer les voies neuronales critiques de ce comportement adaptatif.

Le projet porte un soin particulier au respect de la règle des 3Rs. Les mesures mises en place sont les suivantes

1) Remplacer Le recours à l'animal est imposé par la nature même du projet étudier les bases neurales de la prise de décision, qui peut se faire chez le rat dont le système nerveux central présente des caractéristiques proches de celles de l'homme.

2) Réduire Nous avons calculé le nombre de rats minimal par groupe (15 rats/groupe) pour obtenir des résultats significatifs. Nous avons aussi choisi de recourir le plus largement possible à des interventions réversibles (pharmacogénétiques et optogénétiques) afin de limiter le nombre d'animaux.

3) Raffiner Les rats sont hébergés dans des cages collectives (lorsque c'est possible) avec un milieu enrichi (un tunnel, matériel de nidation, et un bâton à ronger), dans des conditions optimales de température, humidité et lumière (vérifié chaque jour). Pour les procédures chirurgicales, des protocoles appropriés d'analgésie et d'anesthésie seront appliqués. Le suivi post-opératoire sera effectué quotidiennement pour s'assurer de la récupération complète des rats. Des points limites associés à des actions sont identifiés (ex. critères de perte de poids, comportement anormal) pour le cas où les mesures de prises en charge de la douleur et de l'inconfort pouvant résulter de l'étape chirurgicale ne seraient pas suffisantes.

15508 Le COVID-19, acronyme pour coronavirus disease 2019, est une maladie respiratoire détectée pour la première fois en décembre 2019 dans la province de Wuhan en Chine et qui s'est rapidement propagée dans le monde entier. Cette maladie est causée par le nouveau virus SARS-COV-2 (syndrome aigu respiratoire sévère, coronavirus 2). En plus de l'atteinte respiratoire, certains patients atteints de COVID-19 ont également présenté des signes neurologiques tels que l'anosmie, l'agueusie et d'autres signes du système nerveux central tels que maux de tête, nausées, désorientation et vomissement. Des preuves de plus en plus nombreuses montrent que certains coronavirus ne sont pas toujours confinés aux voies respiratoires et qu'ils peuvent également envahir d'autres tissus tel que le cerveau soit par le tronc olfactif, soit par le tronc cérébral via les connexions synaptiques à partir du poumon et des voies respiratoires. On ignore encore si le SARS-COV-2 est neurotrophe et la voie exacte qu'il pourrait emprunter pour atteindre des centres cérébraux précis. Les processus de pathogenèse associés restent inconnus. L'étude du neurotropisme et des mécanismes résultants des attaques du tronc cérébral sera un atout pour le développement et la validation d'approches thérapeutiques innovantes pour le COVID-19.

Afin d'étudier la neuroinvasion et la dissémination du SARS-COV-2 dans le système nerveux central, le laboratoire utilisera des modèles rongeurs reconnus dans le domaine de la physiopathologie de l'infection par le SARS-CoV-2, tels que le hamster doré syrien (*Mesocricetus*

auratus) adulte ainsi que des souris (*Mus musculus*, BALB/c et C57BL/6) génétiquement modifiées exprimant le récepteur ACE2 humain adulte.

Les répercussions de l'inoculation sur la santé des animaux, notamment l'impact sur leur système nerveux, leur activité locomotrice, leurs capacités motrices, olfactives et mnésiques seront aussi étudiées. Enfin l'activité potentielle de molécules antagonistes de l'entrée du virus seront analysés sur l'issue de l'infection dans les 2 modèles de rongeur.

Ces expérimentations suivent la règle des 3R

Remplacement ces expériences viennent compléter des expérimentations effectuées sur culture cellulaire et ne sont utilisées que lorsqu'elles représentent une étape incontournable pour l'avancement de la connaissance scientifique et non actuellement remplaçable par des tests *in vitro*.

Raffinement l'ensemble des procédures sera réalisé de manière à limiter la douleur, la souffrance des animaux (anesthésie,) et l'angoisse (plusieurs souris ou hamster par cage, mise en place d'enrichissement sous la forme d'igloo, de coton,). Enfin, des points limites sont clairement définis et permettent d'éliminer toute souffrance inutile. Si des animaux deviennent malades et atteignent les points critiques, ils seront mis à mort.

Réduction l'analyse des résultats utilise des tests statistiques (ANOVA à 1, 2 ou 3 facteurs) permettant de comparer dans les règles de l'art les données qualitatives ou quantitatives obtenues et limitant le nombre d'animaux au strict nécessaire d'après notre expérience 310 hamsters et 360 souris.

La durée du projet est de 5 ans.

L'utilisation des animaux est décrite au sein de 6 procédures expérimentales, 5 de classe modérée et 1 de classe légère.

15509 Les tendinopathies calcifiantes de la coiffe des rotateurs sont une cause fréquente de douleurs chroniques de l'épaule. Elles sont liées à des dépôts de cristaux d'hydroxyapatite au sein des tendons. Cette pathologie est fréquente puisqu'elle a été rapportée comme la cause de 7% à 54% des douleurs chroniques de l'épaule selon les séries. La cause aboutissant à ces dépôts reste encore inconnue. La calcification se forme progressivement au sein des fibres tendineuses et, une fois constituée, provoque des douleurs chroniques de l'épaule. Cette phase peut durer de quelques mois à quelques années. L'histoire naturelle est ensuite marquée par une phase de résorption aiguë de la calcification au cours de laquelle la calcification se déverse dans la bourse sous-acromio-deltaïdienne, et entraîne une réaction inflammatoire intense qui aboutit ensuite à la disparition de la calcification.

L'objectif de ce protocole est d'étudier la réaction inflammatoire induite par les cristaux dans le phénomène de résorption de la calcification. Pour cela, deux modèles murins seront utilisés un modèle 'air pouch' et un modèle de péritonite. Le premier consistera à injecter les cristaux d'apatite humains dans une cavité mimant la bourse sous-acromio-deltaïdienne. Cette cavité sera constituée sur un modèle de souris par l'injection d'air stérile en sous-cutané. Le deuxième modèle consistera à injecter les cristaux en intra-péritonéal. Ces deux modèles sont déjà utilisés pour l'étude des rhumatismes microcristallins.

Dans le modèle « air pouch », après une injection d'air stérile en sous-cutané sur le dos à J0 et J3, des cristaux issus de calcifications de patients seront injectés dans la poche à J6. Nous étudierons la composition de l'exsudat induit en dosant les cytokines inflammatoires dans l'exsudat (IL-1 β , TNF α , IL-6 et IL-8 notamment). En parallèle, nous réaliserons une étude histologique de la membrane de la poche afin d'en évaluer les modifications : épaisseur, infiltrat cellulaire, vascularisation ainsi qu'une étude d'expression génique des cytokines pro-inflammatoires.

La réaction inflammatoire induite par les cristaux de patients sera comparée à celle induite par les cristaux d'apatite de synthèse pour lesquels il existe quelques données dans la littérature (afflux rapide de leucocytes dans la cavité synoviale, sécrétion locale de TNF α et d'IL1- β). Pour le second modèle, une injection intra-péritonéale de cristaux d'apatite sera effectuée. Après 6 heures, un échantillon de sérum sera récupéré et un lavage péritonéal effectué dans lequel seront quantifiés

les leucocytes ainsi que les cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, IL-8 et TNF α). Là aussi, les souris seront réparties en 3 groupes apatite humaine, apatite de synthèse et groupe contrôle (PBS). Ces expérimentations sur la souris sont nécessaires pour mieux appréhender le phénomène inflammatoire dans son ensemble permettant de faire un lien entre les résultats obtenus *in vitro*.

Le nombre d'animaux utilisés pour mener à bien ce projet sera réduit au strict minimum pour pouvoir conclure de façon statistiquement significative, à savoir 6 animaux par condition. Les analyses seront réalisées à 2 temps pour le modèle air pouch (H6 et H24 après l'injection des cristaux) et à H6 pour le modèle intra-péritonéal. Les expérimentations seront répétées 2 fois afin d'étudier la reproductibilité des effets observés soit un total de 108 animaux. Le bien-être des animaux sera primordial durant les expérimentations, notamment par des phases d'acclimatation, un enrichissement de l'environnement (ajout de papier dans chaque cage pour leur permettre la conception d'un « nid »), une visite quotidienne, une gestion de l'adouléur suivant une échelle stricte et des points limites bien établis.

15510 Depuis les premiers essais cliniques réalisés au cours de la dernière décennie, la thérapie génique apparaît comme une technique thérapeutique prometteuse pour réparer ou remplacer un gène défectueux ou pour exprimer un gène thérapeutique. Pourtant, malgré de très nombreux essais cliniques et des succès incontestables, la thérapie génique souffre encore de certaines limitations qui freinent son transfert dans la pratique clinique quotidienne. Parmi les problèmes qui limitent l'usage des thérapies géniques en clinique on peut citer, d'une part un besoin de méthodes sûres et efficaces pour adresser les gènes thérapeutiques à l'organe cible et d'autre part, un besoin de méthodes non invasives, précises et inductibles pour contrôler localement l'expression génique. Pour répondre à cette problématique nous proposons de combiner 2 méthodes déjà utilisées en préclinique et/ou clinique de manière indépendante. La 1^{ère} méthode permet de faire rentrer le gène d'intérêt directement dans la tumeur, il s'agit de l'électroporation. Un courant électrique va traverser la tumeur, permettant ainsi de faire rentrer l'ADN injecté dans les cellules tumorales. La 2^e méthode est une méthode de chauffage, il s'agit d'appliquer des ultrasons focalisés au niveau de la tumeur. Les ultrasons vont permettre de réaliser un dépôt de chaleur local et suffisamment important pour permettre l'expression du gène injecté. Ainsi, en combinant ces 2 méthodes, nous souhaitons montrer qu'il est possible d'amener un gène à une tumeur et de contrôler son expression grâce à une méthode de chauffage. Cette étude de faisabilité se fera avec un gène d'imagerie.

Pour réaliser ce projet nous prévoyons 12 souris. Ce nombre se justifie par le fait que les conditions et paramètres du protocole ont déjà été mis au point. Notre expérience nous a montré que l'électroporation n'était pas efficace à 100%, ainsi afin d'avoir un nombre d'animaux statistiquement correct, nous prévoyons 12 souris pour finir ce projet.

REPLACEMENT notre projet s'inscrit dans un contexte de thérapie génique pour les tumeurs solides. Le modèle tumoral chez l'animal, faisant appel à la physiologie est difficile à réaliser sans utiliser des animaux.

REDUCTION l'utilisation de l'imagerie optique et donc de gènes rapporteurs nous permet de valider l'efficacité du transfert du gène ainsi que le contrôle de l'expression du gène sur le même animal. Nous prévoyons au maximum 12 souris pour ce projet afin d'avoir au moins 8 souris exploitables.

RAFFINEMENT Les lieux d'hébergement et d'expérimentation sont différents. Le transfert des animaux d'un lieu à l'autre se fait dans une cage de transport dédiée munie d'un couvercle filtrant, à l'abri des regards extérieurs. Le trajet dure quelques minutes. Les animaux sont hébergés en groupes sociaux avec du milieu d'enrichissement (maison en carton, coton). Toutes les procédures sont réalisées sur animal anesthésié et lors de l'anesthésie les animaux sont placés sur un tapis chauffant pour éviter l'hypothermie. Les animaux sont quotidiennement suivis par l'expérimentateur et en cas de signes de souffrance un analgésique sera administré. Si la souffrance persiste, l'expérience sera stoppée.

15511 La maladie athéromateuse coronaire stable consiste en l'obstruction progressive des artères coronaires par le développement de plaques d'athérosclérose provoquant une sténose

d'aggravation progressive. A partir d'un certain degré d'obstruction, ces sténoses peuvent provoquer une baisse significative du flux sanguin d'aval, synonyme d'ischémie, pouvant alors entraîner angine de poitrine, insuffisance cardiaque, infarctus du myocarde ou décès.

La coronarographie est l'examen permettant de visualiser la lumière des artères coronaires à l'aide d'une injection de produit de contraste sous contrôle radiologique afin de déterminer la présence de sténose ou non. Cependant la seule estimation visuelle du degré de sténose est largement démontrée comme insuffisante pour décider de l'intérêt d'une intervention (pontage chirurgicale ou traitement percutané). Il est donc nécessaire de réaliser une évaluation plus précise sur le débit coronaire après cette sténose.

A cette fin, la technique de Fractional Flow Reserve (FFR) permet de mesurer le retentissement fonctionnel de la sténose sur le débit coronaire. Cette technique nécessite au préalable l'injection d'une molécule (adénosine). Plus récemment, dans le prolongement de la FFR, d'autres techniques d'évaluation fonctionnelle ont été développées ayant pour objectif d'éviter le recours à l'adénosine IFR (l'Instantaneous Wave-free Ratio), Pd/Pa. Ces techniques ont l'avantage d'être plus rapides et moins coûteuses. Si des études ont conclu à une non infériorité de ces techniques, il n'en demeure pas moins une discordance systématique de 20%, entre ces nouvelles techniques et la technique de référence FFR, dans la décision de traitement. Variabilité non négligeable au vue de l'importance de la décision qui en découle.

Il semble que certaines conditions de Tension Artérielle et Fréquence Cardiaque favorisent cette discordance entre FFR et évaluation sans adénosine.

Or, si la FFR a clairement démontré la stabilité des mesures indépendamment des conditions de tension et fréquence, l'impact de ces modifications lors des mesures avec les nouvelles techniques (iFR, Pd/Pa) est inconnu.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'impact des conditions hémodynamiques (variations de Tension Artérielle et Fréquence Cardiaque) sur la reproductibilité des techniques d'évaluation fonctionnelle des sténoses coronaires FFR, iFR, Pd/Pa. Ainsi, les trois techniques seront réalisées pour une même sténose dans des conditions hémodynamiques modifiées de manière pré établies.

Il semble contre éthique de réaliser ces expérimentations sur l'homme puisqu'il serait nécessaire de provoquer des conditions hémodynamiques artificielles potentiellement morbides. Nous souhaitons donc réaliser les expérimentations sur les porcs pour leur proximité anatomique et physiologique sur le plan cardiaque.

Une coronarographie sera réalisée de façon identique à l'homme à la différence que l'animal sera sous anesthésie générale. Différentes sténoses seront artificiellement créées. Chacune des techniques sera alors réalisée à l'état basal puis après injection de molécules permettant de moduler les conditions de tension artérielle et de fréquence cardiaque.

La procédure sera répétée avec des degrés de sténose croissants et sur plusieurs des principaux sites artériels du réseau coronaire, afin de reproduire les principales situations cliniques rencontrées en pratique courante.

Conformité avec la règle des 3R

Réduction l'étude présentée fait appel à des techniques déjà utilisées en pratique courante. En outre notre équipe est déjà très qualifiée sur ce modèle. Nous n'avons donc pas la nécessité d'une étude de faisabilité.

Nous pourrons réaliser plusieurs acquisitions et comparaison sur un même animal. Nous ne disposons d'aucune étude expérimentale de référence. Cependant une étude clinique comparable avait analysé 15 sténoses. En anticipant les complications technique et pertes animales (trouble rythmique, thrombose coronaire), nous avons estimé notre besoin à 10 animaux.

Dans la mesure du possible, nous travaillons en collaboration avec différents laboratoires, qui pourront réaliser des prélèvements biologiques post-expérimentation.

Raffinement l'équipe comprend un spécialiste dans la prise en charge du modèle porcin. Nous avons donc prévu un protocole anesthésique adapté afin de prévenir toute forme de douleur à

l'animal. Les techniques de coronarographie seront en parallèle réalisées par des spécialistes du domaine médical.

Remplacement cette étude porte sur la comparaison de techniques déjà utilisées en pratique courante, et maîtrisées par notre équipe. Ces techniques doivent désormais être comparées.

15512 Aujourd'hui les pathologies neurodéveloppementales représentent un véritable problème de santé publique. Si les causes génétiques sont indéniables, une composante environnementale est conjointement impliquée. Des preuves épidémiologiques et expérimentales démontrent que la vie embryonnaire est une période sensible, durant laquelle des perturbations environnementales peuvent entraîner des défauts de l'organisation du cerveau et conduisent à des manifestations plus tardives à l'âge adulte. De nombreuses données indiquent que des infections virales au cours de la période de grossesse pourraient conduire à des pathologies neurodéveloppementales comme la schizophrénie, les troubles du spectre autistique ou les déficiences intellectuelles. Les patients atteints par ces pathologies présentent en plus des atteintes cognitives, des perturbations de la perception/l'interprétation des stimuli sensoriels. Ces défauts vis-à-vis notamment de la douleur pourraient conduire à des comportements d'auto-mutilation. Cependant, bien que susceptible de contribuer aux autres symptômes, ces perturbations sensorielles sont encore peu étudiées. Face à ce problème de santé publique des modèles murins ont été élaborés afin de mieux comprendre le développement et l'origine de ces pathologies. Le modèle d'activation immunitaire maternelle chez la souris (MIA Maternal immune activation) est un modèle établi et reconnu dans la littérature scientifique. Il consiste en l'injection unique de Poly (I : C) (polyinosinic : polycytidylic acid), un ARN double brin mimant une infection virale, à des souris gestantes, 9 à 17 jours après la fécondation. Cette injection au cours de la gestation mime un état transitoire de maladie, parfaitement résolu au bout de 24-48h, sans conséquence et non dommageable sur l'état physiologique des mères. Dans ces conditions expérimentales, les descendants ainsi exposés ne semblent pas affectés dans un premier temps mais présentent à l'âge adulte des perturbations de l'interaction sociale, de l'émotion et des désordres cognitifs légers. Ces phénotypes sont non dommageables dans les conditions d'élevages standards (cage type 2, 4 souris/cage, enrichissement tubes pleins cotonnés). Ils nécessitent des tests comportementaux spécifiques pour être observables et n'affectent notamment ni la survie ni la capacité de reproduction des individus. Cependant, si ces perturbations mimées chez la souris, présentent une forte homologie avec les symptômes observés chez les patients atteints d'une pathologie neurodéveloppementale, les connaissances sont limitées concernant la perturbation des fonctions sensorielles comme la sensation de douleur. Dans ce projet, nous souhaitons utiliser le modèle MIA afin d'évaluer les capacités sensorielles des descendants exposés lorsqu'ils auront atteint l'âge adulte. En effet, selon notre hypothèse, ces descendants pourraient présenter une dys-sensibilité sensorielle modérée dans certaines conditions, non dommageables (jamais décrite car nécessitant une évaluation fine), mais pouvant cependant contribuer aux autres phénotypes. Ce projet ambitionne non seulement de mieux caractériser les dysfonctionnements sensoriels chez ces animaux mais également de définir les perturbations cellulaires et moléculaires impliquées. Ce travail envisage l'utilisation de 288 femelles gestantes (nous comptons au minimum 4 souriceaux par portées pour un fond génétique C57BL/6J) permettant de couvrir nos besoins de 576 mâles sur la base de groupes expérimentaux constitués de 12 animaux. Les 576 femelles de ces fratries ne seront pas étudiées (leurs réponses inflammatoires diffèrent des mâles, leurs comportements sont perturbés par leur cycle sexuel et les pathologies neurodéveloppementales touchent majoritairement le sexe masculin selon May et al. Curr Opin Neurol, 2019). Elles seront mis à mort au sevrage afin de ne pas perturber les portées. Au total ce projet envisage l'utilisation de 1440 souris. Les procédures envisagées sont

- Traitement maternel procédure 1
- Analyses comportementale et sensorielle procédures 2,3,4
- Analyse histologique procédure 5

Une attention particulière sera apportée au respect de la règle des 3R

- Réduire La procédure 1 utilisera le nombre minimum de femelles gestantes pour l'obtention des mâles destinés en premier lieu aux approches comportementales (procédure 2,3,4 12 animaux maximum par groupe). Afin de minimiser le nombre total d'animaux, les analyses cellulaires, moléculaires et histologiques (procédure 5) seront réalisées uniquement sur les individus issus des procédures 2 à 4. Chaque expérience sera réalisée deux fois indépendamment afin d'assurer la validité statistique des résultats.

- Remplacer Bien que notre projet repose sur l'étude *in vivo* de souris, nos hypothèses seront affinées parallèlement par des approches *in vitro* en culture cellulaire permettant de limiter le spectre des questions concernant les interactions cellules-cellules.

- Raffiner Lors des différentes procédures les animaux seront régulièrement suivis. si des animaux présentent un début de signes de souffrance en accord avec notre grille prédictive de point limite, ils seront mis à mort.

15513 Comprendre comment le cerveau se développe, est organisé et fonctionne est fondamental en Neurosciences. L'organisation et la morphologie des différentes cellules constituant le cerveau sont essentielles pour assurer correctement ces fonctions. Plusieurs études réalisées au long des dernières décennies ont pu mettre en évidence que la perturbation de l'expression de différents types de protéines (membranaire, cytosquelette, échafaudage, trafic, etc.) entraîne des défauts dans la croissance et maturation des neurones, mais également dans la formation des réseaux neuronaux. Ces altérations ont pour résultat final une altération des capacités mnésiques et du comportement social chez les individus affectés. C'est ainsi que nous souhaitons étudier, en conditions physiologiques mais aussi pathologiques, l'organisation et la morphologie neuronale au niveau 1) cellulaire, 2) des couches cellulaires, 3) des réseaux neuronaux et 4) de structures cérébrales entières. Pour aboutir à ce projet nous avons créé au sein du laboratoire des lignées de souris transgéniques dans lesquelles différents types de protéines ont été supprimées. Nous souhaitons maintenant étudier le profil d'expression de protéines (différentes de celles supprimées dans nos modèles) dans ces souris ainsi que dans des souris sauvages.

Règle des 3R.

Remplacer Ces projets combinent différents travaux de recherche complémentaires allant de l'étude biochimique ou bio moléculaire aux études *in vivo*. Beaucoup d'études « in-vitro » ont donc été effectuées sur des cellules en culture en amont de l'utilisation de lignées d'animaux pour limiter au maximum leur utilisation. Cependant le modèle animal reste essentiel pour comprendre dans un premier temps si et où ces protéines sont exprimées dans le cerveau ou dans certains sous-compartiments d'intérêt.

Réduire Pour ce projet nous utiliserons 6 lignées de souris dont 5 lignées de souris transgéniques différentes. Nous avons estimé le nombre total d'animaux nécessaire à ces projets à 336 souris sur 5 ans. Afin d'utiliser le nombre minimal d'animaux mais de garantir la validité scientifique et statistique des résultats, nous savons par expérience et en nous référant à la littérature que nos groupes d'animaux doivent être constitués à minima de 12 animaux pour les études immunohistologiques.

Raffiner les animaux seront élevés en groupes sociaux de maximum 8 animaux par cage. Ils auront des éléments d'enrichissement de leur milieu pour leur permettre de mimer au mieux leur comportement naturel (nid de coton). Des points limites suffisamment précoces seront définis pour éviter des souffrances prolongées aux animaux et des mesures de soulagement seront mises en place pour soulager leur mal-être ou douleur (réhydratation, traitements en cas de bagarre).

15514 Selon les données de l'Organisation mondiale de la Santé, le cancer est la deuxième cause de mortalité dans le monde, avec 8.8 millions de décès suite à un cancer (données enregistrées en 2015). Etant donné la complexité et la diversité de cette maladie, il est indispensable de conduire les recherches de preuve de concept de nouveaux traitements dans un contexte reproduisant le plus fidèlement possible la physiopathologie du développement des tumeurs et les interactions des tumeurs avec leur environnement, en particulier le système immunitaire de l'hôte.

Ainsi, l'objectif global de ce projet est la caractérisation de modèles tumoraux et l'évaluation de l'efficacité de produits anti-tumoraux chez la souris humanisée.

Les souris humanisées sont des souris dont le système immunitaire propre est fortement compromis, auxquelles un système immunitaire humain a été greffé. Le fait que les souris présentent un système immunitaire propre défaillant, permet précisément la greffe des cellules humaines qui donneront lieu à la constitution d'un système immunitaire humain fonctionnel d'une part, et la prise tumorale après administration de lignées de tumeurs humaines d'autre part. Les souris humanisées représentent donc un atout majeur dans la recherche en cancérologie puisqu'elles permettent de grandement améliorer la transposition des résultats scientifiques depuis l'animal à l'homme, en offrant une modélisation la plus fidèle possible des interactions entre les tumeurs et le système immunitaire humain.

Le projet comporte trois objectifs

- caractériser des modèles de souris humanisées choisis
- caractériser des modèles tumoraux chez la souris humanisée en évaluant le développement de différentes lignées cellulaires tumorales
- évaluer l'efficacité de différents produits anti-tumoraux sur des modèles murins tumoraux chez la souris humanisée

La caractérisation et la validation du modèle de souris humanisée sera faite par des analyses cellulaires sur des prélèvements sanguins des souris au cours de l'étude, permettant de valider la bonne prise de la greffe des cellules humaines, et de suivre le développement du système immunitaire humain chez les souris, permettant de raffiner les modèles animaux.

Lorsqu'un modèle tumoral serait mis en place dans les souris humanisées, la croissance des tumeurs solides implantées en sous-cutané sera suivie à minima par mesures au pied à coulisse. L'évolution des tumeurs solides implantées en sous-cutané ou non pourront être suivies par imagerie aux rayons X. Enfin, l'évolution des tumeurs solides et les cancers dits "liquides" pourra être suivie par imagerie de bioluminescence ou par imagerie de fluorescence. Les trois méthodes d'imagerie citées ci-dessus présentent l'avantage d'être non invasives, puisqu'elles nécessitent seulement une anesthésie légère. De plus, elles donnent la possibilité de suivre les mêmes animaux au cours de l'étude, permettant, ainsi de s'affranchir de l'impact de la variabilité individuelle, et de réduire le nombre d'animaux nécessaires pour répondre aux objectifs de réduction du nombre d'animaux du projet.

Afin de répondre à l'objectif de ce projet, le recours à l'expérimentation animale est nécessaire car il n'existe pas à ce jour de méthode alternative de remplacement permettant de modéliser de manière fiable un système immunitaire complet d'une part et la progression d'une tumeur dans un corps entier d'autre part.

Un suivi quotidien des animaux sera réalisé, afin de détecter tout signe clinique anormal, spécifiques ou non au modèle tumoral étudié et/ou à l'humanisation. Une attention toute particulière sera portée à leur hébergement et leur environnement ainsi qu'aux soins de ces animaux afin d'éviter toute contamination pouvant interférer avec les résultats de l'étude et pouvant potentiellement invalider celle-ci. Des critères d'interruption ou « points limites » seront définis tout au long de ces études. Des méthodes pour prévenir l'apparition de ces points limites et essayer dans la mesure du possible de les traiter seront mises en place, sans interférer avec l'objectif de l'étude en cours (injection de fluides, d'analgésiques, isolement, réchauffement, etc).

Un total de 1800 souris au maximum pourra être utilisé dans ce projet.

- 15515** Le Toll-like-récepteur-3 (TLR3) est exprimé par les cellules immunitaires et épithéliales normales ainsi que de très nombreux cancers solides. Le concept du TLR3 comme cible anticancéreuse existe depuis près de 30 ans, même si leur mécanisme exact n'est connu que depuis peu. En effet, l'activation de ce récepteur entraîne la mort spécifique des cellules cancéreuses (mais pas des cellules normales), ainsi qu'une inflammation ayant un effet antitumoral. La conjugaison de ces deux mécanismes d'action devant induire, à terme, une vaccination contre la tumeur. Malgré cette

efficacité clinique reconnue, aucun activateur de ce récepteur n'a jusqu'ici obtenu l'autorisation de mise sur le marché en raison de manque d'homogénéité (taille, structure et séquences), d'effets toxiques ou de manque d'efficacité. Une nouvelle famille de ligands de ce récepteur a récemment été découverte (dont le candidat médicament de cette étude), homogènes, actifs, spécifiques et très peu toxiques.

Une étude pilote, réalisée sur un modèle murin MBT2-C3H/HeN de cancer de la vessie (possédant un système immunitaire complet et une tumeur greffée sur le flanc), a permis d'objectiver l'efficacité de ce nouveau médicament, induisant un tiers de rémissions tumorales complètes et permettant un allongement de l'espérance de vie moyenne d'un facteur 3 à 4. Ce projet consiste donc à comprendre les mécanismes d'action précoces et séquentiels de ce traitement en se focalisant sur trois temps d'intérêt (J3, J8 et J12 après le début du traitement), en utilisant ce même modèle de cancer de la vessie et dans les mêmes conditions. Ce modèle de tumeur n'a pas d'impact spécifique sur la douleur ou la physiologie de la souris, si ce n'est un manque d'homogénéité reconnu.

Le Projet est découpé en 3 procédures séquentielles

La Procédure-1 (15 souris) : Correspond à la "Mise au Point" du modèle et des techniques sur des tumeurs non traitées. Elle permettra d'évaluer la pousse tumorale et de considérer l'étape de faisabilité des analyses sur tissus.

La Procédure-2 (30 souris) : Consiste à effectuer une petite "Etude Pilote" sur les mécanismes d'action en comparant le traitement versus son contrôle mais à un seul temps d'intérêt permettant de voir l'ensemble des sous-types cellulaires attendus.

La Procédure-3 (180 souris) : Correspond à l'"Etude Complète". Elle consiste à déterminer les mécanismes d'action du candidat médicament sur les cellules tumorales et les mécanismes d'action immunologiques. Comme pour la procédure-2, cette étude comparera le traitement versus son contrôle mais aux trois temps d'intérêt et sera répétée une fois pour s'assurer de la reproductibilité des résultats.

Chacune des procédures s'articulera en deux phases

- Une première phase de suivi cinétique des marqueurs solubles et cellulaires de l'inflammation dans le sang circulant au cours du traitement.

- Une seconde phase de prélèvement terminal pour déterminer, à chacun des trois temps d'intérêt, quelles sont les cellules immunitaires activées dans le sang, la tumeur et les différents organes.

L'ensemble du projet nécessitera 225 souris.

- La « Réduction » du nombre d'animaux sans mettre en péril une interprétation statistique des résultats sera respectée en utilisant les méthodes statistiques adaptées aux petits nombres. Une procédure de "Mise au Point" de l'expérience ainsi qu'une "Etude Pilote" sont prévues pour mettre au point les techniques et permettre une adaptation des protocoles par rapport au modèle sur un petit nombre d'animaux. Chaque expérience concluante sera répétée au maximum une fois et si possible en l'intégrant dans les contrôles de l'expérience suivante.

- Le « Raffinement » sera respecté par la mise en place d'une définition précises de points limites précoces et prédictifs, bien que peu d'effets soient attendus aux temps d'expérimentation qui restent très courts (J3, J8 et J12). Une surveillance adaptée des animaux 3 fois par semaine permettra d'éviter toute souffrance des animaux. Les prélèvements seront réduits au maximum en quantité et en durée et la différence de volémie compensée. Les actes chirurgicaux seront effectués sous anesthésie générale après administration d'un analgésique. De nombreuses analyses seront réalisées sur les différents prélèvements pour documenter et obtenir le maximum d'informations sur ces modèles précliniques pour ne pas avoir à recommencer ces expériences.

- Ces expériences sur petits animaux ne peuvent pas être "Remplacées". Seul un modèle in-vivo sera à même de mimer l'efficacité antitumorale et autovaccinale de ce candidat médicament au cours des différentes étapes de la progression tumorale.

Ce projet s'inscrit donc dans le cadre de développement d'une application thérapeutique applicable chez le patient.

15516 Dans nos sociétés vieillissantes, les problèmes de mémoire liés à des conditions pathologiques ou à l'âge prennent une place grandissante. Il devient donc crucial de comprendre les mécanismes neurobiologiques de la mémoire pour améliorer les diagnostics médicaux et développer de futurs traitements. Bien qu'intimement liée à la mémoire, l'olfaction est un sens encore peu étudié en recherche. Pourtant, les odeurs influencent fortement nos actions, par exemple en stimulant notre appétit ou nous prévenant de dangers à venir. La signification associée aux odeurs rencontrées, qui permet la production de comportements adaptés, est le plus souvent apprise par expérience et semble être contrôlée via l'intermédiaire de récepteurs spécifiques présents dans le cerveau, les récepteurs cannabinoïdes de type 1 (CB1). Cependant, les mécanismes d'actions des récepteurs CB1 et les circuits neuronaux responsables de ces comportements restent à ce jour méconnus. Ainsi, le but de ce projet est de comprendre les processus de mémoire olfactive lorsqu'une odeur est associée à une récompense (eau sucrée – conditionnement appétitif) ou une sensation désagréable (boisson amère - conditionnement aversif), ainsi que le rôle joué par les récepteurs CB1.

Ce projet sera réalisé chez la souris pour laquelle l'odorat est une modalité sensorielle majeure, nécessaire à l'établissement de comportements cruciaux pour la survie de l'individu (alimentation, reproduction, interactions sociales...). Nous testerons l'impact des récepteurs CB1 et de certains types de neurones sur l'activité des circuits neuronaux et sur le comportement de l'animal lors des conditionnements appétitifs et aversifs. Pour cela, nous enregistrerons l'activité de dizaines de neurones grâce à des électrodes très fines placées au préalable dans les régions cérébrales impliquées lors des tâches comportementales. Nous suivrons aussi, en simultané, la respiration de l'animal grâce à des outils peu invasifs qui laissent l'animal libre de ses mouvements.

- Remplacement : La souris fait partie de la famille des Vertébrés, comme l'Homme, et elle est capable de fonctions cognitives relativement complexes elle représente donc un modèle d'étude particulièrement intéressant pour comprendre le fonctionnement du cerveau humain. Nous étudierons les circuits neuronaux des souris alors que ces dernières effectueront une tâche comportementale il nous faudra donc travailler avec des animaux vigiles. Par conséquent, il nous sera impossible de conduire cette étude *in vitro*. Enfin, dans l'état des connaissances actuelles, les questions que nous adressons ne peuvent malheureusement pas être réalisées *in silico*.

- Réduction : Le nombre total d'animaux requis pour ce projet est de 400 souris sur 5 ans. Les techniques d'enregistrement (électrodes très fines) que nous prévoyons d'utiliser permettent de réduire considérablement le nombre d'animaux utilisés car un grand volume de données pourra être collecté sur plusieurs jours au sein d'un même animal. Ce nombre sera réduit davantage grâce à nos études pilotes qui permettront une optimisation des paramètres de nos expériences.

- Raffinement : Nos souris seront hébergées en portoir ventilé, dans des conditions qui favorisent l'expression de leurs comportements naturels petits groupes sociaux (maximum 5 souris par cage) au moins jusqu'au début de leur entraînement, cages enrichies d'éléments permettant de construire un nid (carré de coton, petites maisons en carton, frises de papier kraft) ou de favoriser l'exploration (jouets). Le bien-être de chaque animal sera évalué quotidiennement et une fiche de suivi individuel sera créée pour chaque procédure expérimentale. A partir des critères définis dans ces fiches, les expérimentateurs et techniciens animaliers seront informés des procédures à suivre pour limiter toute souffrance chez nos souris.

15517 Suite à l'obtention de résultats très prometteurs montrant l'efficacité d'un traitement de thérapie moléculaire dans le cadre de la glycogénose de type 1a, une étude préclinique réalisée chez la souris devrait permettre de proposer une thérapie pour les patients atteints de cette maladie génétique rare. Dans la glycogénose de type 1a, des mutations touchent un gène impliqué dans la production de glucose (sucre) par l'organisme. Cette fonction qui permet le maintien de la glycémie (taux de sucre dans le sang) autour de 1g/l en dehors des périodes de repas, est assurée par le foie, les reins et l'intestin. Ainsi, les patients atteints de glycogénose de type 1a développent des hypoglycémies sévères rapidement après un repas qui peuvent conduire au coma hypoglycémique et à la mort. En absence de traitement, ces patients doivent manger très régulièrement, y compris la nuit, et suivre un régime très strict pour éviter les pathologies associées à l'accumulation de

glycogène (stock de sucre) et de graisses dans le foie et les reins. Ainsi, en plus des hypoglycémies très fréquentes chez les enfants, la plupart des patients adultes développent un foie gras et des tumeurs hépatiques, mais aussi une maladie chronique rénale.

La thérapie moléculaire développée vise à rétablir au sein des cellules du foie et des reins la production de glucose. Dans un premier temps, l'efficacité de la molécule étudiée a été démontrée dans un modèle de souris qui reproduit toute la pathologie humaine hépatique de la glycogénose de type 1a. Ces souris développent la maladie uniquement dans le foie, et les souris sont capables de produire du glucose au niveau des reins et de l'intestin. Cependant, ces souris ne peuvent pas utiliser leur stock de glycogène hépatique pour maintenir leur glycémie juste après un repas ainsi elles peuvent présenter des hypoglycémies modérées dans les premières heures de mise à jeun, mais elles sont capables de réguler ensuite leur glycémie si le jeûne se prolonge.

L'injection de la molécule étudiée, administrée par voie intraveineuse, a permis à ces souris atteintes de glycogénose de type 1a dans le foie de diminuer significativement les stocks de glycogène hépatique et de réguler leur glycémie au court d'un jeûne très court. L'efficacité du traitement est dépendante de la dose et a été maintenue pendant environ 10 jours. Avant de proposer une étude clinique, des études complémentaires sont nécessaires pour tester de nouvelles molécules plus stables et ciblant à la fois les cellules du foie et les cellules du rein.

Ce projet aura pour premier objectif de tester l'efficacité de nouvelles molécules ciblant la production de glucose pour espacer les injections et/ou diminuer les doses de produit à injecter en maintenant une glycémie autour de 1g/L. Le deuxième objectif est de prévenir le développement de la maladie rénale en rétablissant la production de glucose au niveau du rein. Pour cela, les molécules seront testées dans un modèle de souris atteinte de glycogénose de type 1a spécifiquement dans les reins. Ces souris ne souffrent pas d'hypoglycémie car elles produisent du glucose par le foie. De plus, la maladie rénale reste silencieuse, sans induire de mal-être animal pendant plusieurs mois.

Ce projet sera réalisé en respectant la règle des 3R.

Remplacement : La fonctionnalité des nouvelles molécules est d'abord validée en cellules mais leur efficacité ne peut être validée que chez un organisme malade puisque ces molécules, injectées dans la circulation sanguine, vont agir sur une fonction régulée par plusieurs organes (foie, rein, pancréas, cerveau).

Réduction : Ces tests seront réalisés avec un nombre minimum de souris pour pouvoir valider l'utilisation d'un médicament ensuite chez l'homme.

Le nombre de souris a été calculé au plus juste à partir des connaissances de la pathologie dans ces modèles animaux, du métabolisme du glycogène, de la régulation de la glycémie au cours du jeûne et des résultats d'études précédentes. Afin de pouvoir faire une analyse statistique, des groupes de 10 souris seront analysés. Au total, ce projet nécessitera l'obtention de 280 souris mâles transgéniques et de 140 souris non transgéniques utilisées comme contrôle.

Les souris femelles transgéniques non utilisées dans ce projet seront destinées à la reproduction ou seront incluses dans un autre projet.

Dans un souci de raffinement des méthodes, les souris seront hébergées par groupe, dans un milieu enrichi pour favoriser la nidation. La connaissance des modèles animaux a permis de définir des points limites, en contrôlant les périodes de risque d'hypoglycémie pour le modèle hépatique. Pour ces souris, la nourriture est accessible directement dans la cage pour assurer son accès aux souris qui seraient affaiblies par une baisse de glycémie et qui ne pourraient pas atteindre les mangeoires. De plus, le temps de mise à jeun sera limité à 2h30 pour réduire le mal-être des animaux non traités. L'atteinte des points limites lors d'une mise à jeun entraîne l'injection de glucose et la renutrition immédiate de la souris. Pour limiter l'hypothermie liée à l'hypoglycémie, les animaux auront la possibilité de se réchauffer en disposant une partie de la cage sur une plaque chauffante lors des mises à jeun. Les animaux seront traités entre 2 et 8 mois après l'induction de la maladie hépatique ou rénale. A ce stade, les atteintes hépatiques ou rénales restent silencieuses et non associées à un mal-être, en dehors des périodes d'hypoglycémie qui seront surveillées. Les souris seront mises à mort à la fin du protocole ou lors de l'atteinte d'un point limite défini dans le projet selon les méthodes autorisées par la législation.

En conclusion, ces études réalisées chez la souris devraient permettre de proposer une nouvelle approche thérapeutique pour les patients atteints de glycoséose de type 1a. Au total, cette étude nécessitera 420 souris sur une durée de 3 ans.

15518 Comprendre comment le cerveau se développe, est organisé et fonctionne est fondamental en Neurosciences. L'organisation et la morphologie des différentes cellules constituant le cerveau sont essentielles pour assurer correctement ces fonctions. Plusieurs études réalisées au long des dernières décennies ont pu mettre en évidence que la perturbation de l'expression de différents types de protéine (membranaire, cytosquelette, échafaudage, trafic, etc.) entraîne des défauts dans la croissance et maturation des neurones, mais également dans la formation des réseaux neuronaux. Ces altérations ont pour résultat final une altération des capacités mnésiques et du comportement social chez les individus affectés.

Au long de ces dernières années notre laboratoire est devenu multidisciplinaire et a accumulé les compétences nécessaires pour la réalisation d'études scientifiques incluant divers types d'expériences, allant de l'étude biomoléculaire de certaines protéines d'intérêt jusqu'à l'étude du rôle de ces mêmes protéines dans le comportement et les capacités mnésiques des rongeurs. Pour ce faire, chacune de ces études a eu pour base la vérification de l'expression des protéines d'intérêt dans le cerveau de rongeurs. C'est ainsi que cette étude pilote d'expériences immunohistologiques est nécessaire pour déterminer le profil d'expression de nouvelles protéines dans le cerveau. Le résultat de ces expériences représente la base des futures études du laboratoire.

Règle des 3R.

Remplacer Ces projets combinent différents projets de recherche portant sur l'étude de différentes protéines impliquées dans diverses voies de signalisation ou fonctions cellulaires. Beaucoup d'études « in-vitro » ont donc été effectuées sur des cellules en culture en amont de l'utilisation de lignées d'animaux pour limiter au maximum leur utilisation. Cependant le modèle animal reste essentiel pour comprendre dans un premier temps si et où ces protéines sont exprimées dans le cerveau ou dans certains sous-compartiments d'intérêt.

Réduire Pour ce projet nous utiliserons des rats Sprague Dawley indépendamment de leur sexe de façon à réduire au maximum le nombre d'animaux à utiliser. Pour la même raison, un même rat servira pour effectuer le plus possible d'essais immunohistologiques.

Raffiner les animaux seront élevés en groupes sociaux en cage collective. Ils auront des éléments d'enrichissement de leur milieu pour leur permettre de mimer au mieux leur comportement naturel (nid de coton). Des points limites suffisamment précoces seront définis pour éviter des souffrances prolongées aux animaux et des mesures de soulagement seront mises en place pour soulager leur mal-être ou douleur (réhydratation, traitements en cas de bagarre).

Pour ce projet nous utiliserons 96 rats Sprague Dawley sur 5 ans.

15519 L'obésité, qui est classée en tant qu'épidémie depuis 1997 par l'OMS, touche plus de 1,9 milliards d'adultes dans le monde. De plus, l'OMS prévoit qu'un quart de la population mondiale sera obèse d'ici 2045. L'obésité qui se caractérise par une surcharge pondérale, est associée au développement de nombreuses complications, le développement d'un diabète de type 2, l'apparition d'un foie gras, de maladies cardiovasculaires ou de divers cancers.

Face à ce fléau, il est crucial de trouver des molécules capables de prévenir ou de traiter ces maladies métaboliques et de mieux comprendre leur mécanisme d'action. Dans ce contexte, la production intestinale de glucose (PIG) est une fonction particulièrement intéressante, puisqu'elle contrôle positivement le métabolisme. La détection dans la veine porte du glucose produit par l'intestin initie un signal nerveux qui active certaines aires cérébrales importantes dans la régulation du métabolisme. L'induction de la PIG entraîne un ensemble de réponses dans différents organes, lesquelles concourent à un meilleur contrôle du métabolisme glucidique (meilleure sensibilité à l'insuline, effet anti-diabète) et du poids (diminution du stockage des graisses, effet anti-obésité).

Dans le laboratoire, il a été démontré que l'induction de la PIG était directement impliquée dans les effets bénéfiques des protéines et des fibres alimentaires. En effet, les protéines sont connues pour

leur effet « coupe faim » et les fibres solubles dites « prébiotiques » améliorent notamment la sensibilité à l'insuline et réduisent les taux de cholestérol sanguin chez des sujets sains, obèses et diabétiques. Tout le long de l'intestin et en particulier au niveau du côlon, la dégradation de ces composés alimentaires par le métabolisme intestinal de l'hôte ou des bactéries intestinales va fournir des métabolites qui peuvent moduler la PIG.

Dans cette étude, nous nous intéressons plus particulièrement à deux familles de métabolites présents en grande quantité dans les aliments riches en fibres ou en protéines les polyamines et les polyphénols, connus pour leurs effets bénéfiques tels qu'une diminution du poids, de la masse grasse, de l'accumulation de lipides dans le foie, ou encore une amélioration de la sensibilité à l'insuline et du contrôle glycémique. De façon intéressante, ces effets bénéfiques sont également observés en présence d'une induction de la PIG.

Ainsi, nous chercherons à 1/ déterminer si ces métabolites sont capables d'activer la PIG, soit en tant que substrat, soit en induisant l'expression de gènes clés de la production endogène de glucose, comme celui codant pour la glucose-6-phosphatase (G6Pase); et 2/ démontrer que cette induction de la PIG est un mécanisme nécessaire pour observer les effets bénéfiques de ces différents métabolites.

Dans cette étude, chaque composé sera ajouté à une alimentation hypercalorique qui sera donné à des souris contrôles et dépourvus de PIG, et nous étudierons les impacts sur le poids, la quantité de graisses dans le foie et le métabolisme glucidique.

Ainsi, le but de cette étude est de trouver des métabolites d'origine alimentaire capables d'activer la PIG qui pourrait, par l'intermédiaire de ses effets bénéfiques sur le métabolisme, représenter une cible thérapeutique intéressante dans la lutte contre l'obésité et ses maladies associées.

Ce projet sera réalisé selon le respect de la règle des 3R (remplacement, réduction, raffinement)

Remplacement et réduction Afin de réduire le nombre d'animaux nécessaires, nous avons choisi, dans un premier temps de réaliser au préalable une étude de screening *in vitro* sur des cellules intestinales (cellules Caco2) en culture afin de sélectionner les molécules qui ont la capacité de moduler la PIG. Ce screening *in vitro* permet de remplacer une partie de l'étude utilisant des animaux avec des études sur cellules en culture. A la suite de ces études, nous souhaitons nous diriger vers des expériences *in vivo* sur des modèles animaux puisque la PIG exerce un contrôle sur l'ensemble du métabolisme et implique des dialogues inter-organes. Plus précisément, nous utiliserons des souris sauvages et transgéniques dépourvus de PIG, qui nous permettront de mettre en évidence le rôle de la PIG.

Afin de réduire le nombre d'animaux dont nous avons besoin, nous avons calculé le nombre de souris au plus juste à partir des connaissances des pathologies étudiées, des modèles animaux, et du métabolisme glucidique, mais aussi des résultats d'études précédentes ayant permis de valider la preuve de concept. Afin de pouvoir faire une analyse statistique, des groupes de 8 souris seront analysés. Au total, ce projet nécessitera l'obtention de 384 souris mâles transgéniques et contrôles au maximum.

Raffinement Les souris seront hébergées par groupe, dans un milieu enrichi (coton, envirodry, abris carton, bois à ronger...) pour favoriser la nidation. Les animaux seront observés quotidiennement et pesés régulièrement pour suivre leur prise de poids. Les procédures sont maîtrisées par les personnes en charge de l'expérimentation animale. Nous avons choisi d'apporter chacun des métabolites par voie orale grâce à une supplémentation dans l'alimentation hypercalorique afin de limiter le stress et la toxicité associés à des injections ou des gavages quotidiens.

Les souris seront mises à mort à la fin du protocole ou lors de l'atteinte d'un point limite défini dans le projet selon les méthodes autorisées par la législation.

15520 La septicémie, principale cause d'admission dans les unités de soins intensifs, est caractérisée par une réponse inflammatoire généralisée résultant d'une infection non contrôlée. Lorsque cette pathologie se développe, l'organisme subit une cascade de changements dont une augmentation de la perméabilité vasculaire qui a pour conséquence un moindre apport sanguin aux organes. Cet afflux sanguin altéré finit par provoquer des dysfonctions d'organes qui se traduisent bien souvent

par le décès des patients. Des publications récentes ont proposées deux nouveaux traitements (combinaison de corticoïdes ou inhibiteurs adrénergiques). Ces traitements semblent prometteurs, mais aucune donnée n'a été publiée, à ce jour, concernant leurs effets sur la perméabilité vasculaire. Dans ce projet, nous testerons les effets de l'aténolol (β 1-bloquant adrénergique) ou de la combinaison hydrocortisone+fludrocortisone (corticoïdes) chez des souris septiques. Pour cela, nous serons amenés à employer deux modèles de sepsis internationalement reconnus, le modèle par péritonite (CLP) et le modèle par administration de lipopolysaccharide (LPS). Les souris seront réparties en 12 groupes (Contrôle, Contrôle-Aténolol, Contrôle-corticoïdes, LPS, LPS-Aténolol, LPS-corticoïdes, sham, sham-Aténolol, sham-corticoïdes, CLP, CLP-Aténolol, CLP-corticoïdes). L'utilisation d'animaux, dans cette étude, est dictée par la complexité de cette pathologie touchant plusieurs organes simultanément. L'effet ne peut donc être considéré qu'à l'échelle d'un organisme. De plus, il existe une bonne corrélation entre les données obtenues chez les souris (en cas de synergie des résultats du modèle LPS et du modèle CLP) et l'homme au cours du sepsis (remplacement). Pour limiter le nombre d'animaux, nous nous sommes appuyés sur les travaux antérieurs réalisés au sein du laboratoire, sur une analyse bibliographique poussée de cette pathologie et une optimisation des prélèvements sanguins et des prélèvements tissulaires (cœur, foie, reins, poumons, surrénales, muscles squelettiques) effectués après euthanasie sur chaque animal. Nous nous sommes également limités à l'utilisation d'une dose pour chaque traitement (réduction). Une attention particulière sera portée au bien-être animal à travers un suivi régulier des souris et ce afin de déceler tout excès de douleur, ce qui introduirait un biais dans nos recherches. Ce suivi a été planifié selon les critères définis dans le document ci-après et reconnu au niveau international (raffinement). Au total, nous serons amenés à utiliser 540 souris pour cette étude.

15521 Le bisphénol A (BPA), reconnu comme perturbateur endocrinien, est un plastifiant utilisé afin de produire des contenants alimentaires dans l'industrie agro-alimentaire, et a des effets délétères sur la fonction reproductive (hypothalamus et gonades) des mâles et des femelles, ayant entraîné l'interdiction de son utilisation en France dans l'industrie agro-alimentaire. C'est pourquoi de nouveaux analogues du BPA, dont le bisphenol S (BPS), ont émergé afin de remplacer le BPA. Il est donc important d'étudier les effets du BPS chez l'humain, notamment avant que l'exposition environnementale du BPS augmente, les premières données obtenues suggérant que les 2 molécules (BPA et BPS) ont des effets similaires. Etant donné qu'il est difficile de réaliser une étude chez l'humain, le modèle brebis a été retenu. En effet ce modèle animal présente une plus grande proximité physiologique avec l'espèce humaine en terme de reproduction (durée du cycle oestral, durée de gestation, nombre d'ovulation) par rapport aux modèles rongeurs classiquement utilisés. Les cellules de rongeurs sont par ailleurs plus résistantes aux bisphénols (de 10 à 100 fois) par rapport aux cellules humaines. Ce projet vise à étudier comment le bisphénol S peut affecter le développement de l'ovaire du nouveau né après une exposition au cours de la gestation. Ce projet consistera à exposer 2 lots de brebis en gestation, avec 0 ou 50 μ g/kg/jour de bisphénol S, entre 1 et 4 mois de gestation, soit pendant 3 mois, via leur alimentation, puis à réaliser après la naissance des agnelles des prises de sang ainsi que des mesures par IRM de la population folliculaire de l'ovaire afin de mesurer l'impact de l'exposition au bisphénol S sur le développement de l'ovaire et sur la réserve ovarienne.

Ce projet respecte la règle des 3R :

Remplacement pour comprendre les effets d'une exposition prolongée au bisphénol S chez l'humain, le recours à une espèce animale est nécessaire. Le modèle ovin a été retenu, car il ne présente pas de résistance naturelle à ce composé, contrairement au modèle rongeurs.

Raffinement les agnelles utilisées dans ce projet (2 groupes de 20 agnelles) seront placés sous surveillance quotidienne (activité, comportement) et hébergées dans une bergerie avec aire paillée intégrale, facilité d'accès à la nourriture et à l'eau et répondant aux normes d'élevage chez cette espèce. Les animaux seront maintenus en groupes sociaux stables. Les déplacements se feront dans le calme. Les mises à jeun avant IRM seront limitées à 24H avec accès à l'eau jusqu'à la veille au soir de l'intervention. Les IRM seront réalisées après anesthésie des animaux.

Réduction le protocole expérimental permet de réduire au maximum le nombre d'agnelles grâce à l'utilisation de l'IRM qui permet de suivre les mêmes individus pour les différentes mesures effectuées. Deux lots de 25 brebis sont nécessaires pour évaluer les effets de l'exposition au bisphénol S sur le développement ovarien. Cela correspondra environ à 2 groupes de 20 agnelles. L'examen IRM n'étant réalisé que sur les agnelles, il ne sera réalisé que sur 40 animaux maximum.

15522 La sélection des porcs est traditionnellement évaluée par la mesure de leurs performances de croissance lorsque les animaux reçoivent des aliments de bonne qualité leur permettant d'exprimer leur potentiel de croissance.

Dans un contexte de diversification des modes de production, des aliments contenant des matières premières plus difficiles à digérer, sont de plus en plus utilisés dans les élevages de production, notamment pour réduire le coût de production lié à l'alimentation.

L'efficacité digestive est donc une composante importante à évaluer pour disposer d'animaux mieux adaptés à ces systèmes. Une mesure de l'efficacité digestive utilisable en animalerie expérimentale a donc été développée pour identifier des animaux digérant efficacement l'aliment. La méthode de mesure s'appuie sur l'analyse de la composition chimique des fèces des animaux.

De précédents travaux ont montré que l'efficacité digestive était un caractère intéressant à sélectionner car variable, héritable et corrélé à l'efficacité alimentaire des porcs. Toutefois, pour une mise en place opérationnelle de la mesure en élevage, il est important de déterminer l'âge optimal de réalisation des prélèvements de fèces pour discriminer précisément les animaux sur leurs performances d'efficacité digestive.

Pour cela, deux échantillons de fèces seront collectés pour 700 porcs à deux âges différents afin d'évaluer leur efficacité digestive au milieu (16 semaines d'âge) et en fin d'engraissement (21 semaines). Ces porcs seront élevés en groupe dans des conditions proches de celles rencontrées en élevage et leurs consommations d'aliments seront enregistrées à l'aide de distributeurs automatiques d'aliments.

Ce protocole sera conduit sur une période de huit mois. A l'aune de travaux précédents, le nombre d'animaux a été calibré pour avoir une puissance statistique suffisante pour estimer les corrélations génétiques et phénotypiques entre les deux mesures d'efficacité digestive et avec les caractères de croissance et de consommation alimentaire enregistrés par ailleurs.

Le projet a été élaboré dans le respect de la règle des 3R.

Remplacement les mesures sur animaux sont requises car l'objectif de l'étude est d'explorer l'intérêt d'un nouveau critère de sélection (l'efficacité digestive) et ses modalités de mise en œuvre pour lequel aucune donnée n'est disponible en routine dans les populations sélectionnées.

Réduction le nombre d'animaux du protocole a été calibré afin de disposer du nombre minimum d'échantillons pour permettre l'estimation des paramètres génétiques de ce caractère avec une puissance statistique suffisante.

Raffinement les méthodes de phénotypage développées permettent d'élever les animaux en groupe dans des conditions d'élevage normales et sont applicables à un prélèvement ponctuel de fèces par animal. Elles constituent donc un progrès important par rapport aux méthodes de mesure de référence qui requièrent l'élevage des porcs en loge individuelle. Par ailleurs, toutes les mesures seront réalisées par du personnel formé et expérimenté.

15523 Nous proposons une formation qualifiant des personnels amenés à concevoir des projets et des procédures expérimentales, ouverte aux ingénieurs et chercheurs des laboratoires publics et privés, dans le cadre de la formation continue, ainsi qu'à des doctorants en biologie.

Ce type de formation réglementaire à l'expérimentation animale doit permettre l'acquisition de compétences théoriques et pratiques permettant la manipulation d'animaux dans le respect de leur bien-être. Conformément à l'agrément de cette formation par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, il s'agira d'enseigner de bonnes pratiques pour la réalisation des

méthodes de préhension, de contention, d'injections et d'anesthésie chez la souris de laboratoire. Ces actes sont, de sévérité légère pour l'animal.

Pour répondre à cet objectif, les travaux pratiques que nous souhaitons proposer permettent une familiarisation progressive des stagiaires avec l'animal de laboratoire. Ils sont réalisés en effectif réduit, sous la tutelle d'enseignants et de techniciens expérimentés portant grande attention au bien-être de l'animal. Des enseignements plus théoriques d'éthique, d'éthologie, de physiologie du stress et de nociception viennent compléter ces connaissances afin que les stagiaires soient en mesure d'adapter leur pratique au comportement de l'animal qu'ils manipulent.

Le choix de la souris s'explique par l'utilisation majoritaire de ce modèle animal en expérimentation, les personnels en formation étant essentiellement amenés à manipuler ces espèces dans leurs laboratoires.

De plus, certains actes pratiqués étant de sévérité légère, les animaux pourront suivre deux gestes techniques, ce qui va dans le sens d'une réduction du nombre d'animaux manipulés. Chaque stagiaire ne réalisera pas l'ensemble des gestes techniques.

Ces TP nous permettront un maximum de confort aux animaux manipulés. Ainsi, lors des anesthésies, les yeux de souris seront protégés d'une déshydratation par de un collyre "ocry gel" et stabuleront sur un tapis chauffant permettant de réduire la chute de la température corporelle. Les prélèvements au sinus rétro-orbital seront uniquement réalisés après anesthésie locale par quelques gouttes de tétracaïne. Chaque geste est scrupuleusement surveillé afin de détecter tout signe de souffrance au cours de ces manipulations. Les encadrants interviennent de suite afin de mettre à mort l'animal.

Enfin, afin de limiter la manipulation de ces animaux et d'en restreindre l'effectif, des supports vidéos se substitueront à certaines démonstrations (gavages, injections intraveineuses au niveau de la veine de la queue).

Cette session de TP comprendra au maximum de 56 stagiaires répartis sur 4 séances. Une souris est prévue par étudiant, ce qui nous semble nécessaire à un bon apprentissage. Un animal surnuméraire est également prévu pour les démonstrations réalisées par l'enseignant. On utilisera donc 56 (nombre de stagiaires maximum) + 4 (nombre de TP) soit 60 souris au maximum par an, soit 300 souris pour 5 ans.

15524 La pandémie de COVID19 est responsable de plus de 215000 décès dans le monde au 29 avril 2020. L'agent responsable, SARS-CoV-2, est un virus dont la transmission interhumaine se produit par des gouttelettes respiratoires ou des surfaces contaminées. La plupart des patients présentent une légère infection des voies respiratoires, généralement caractérisée par de la fièvre (82%) et de la toux (81%). Une pneumonie sévère et un syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) ont été décrits dans 14% des cas signalés, et la mortalité globale est d'environ 1 à

2%. Des approches thérapeutiques sont en cours de développement, mais la sécurité et l'efficacité potentielle restent à déterminer. L'irradiation thoracique à des faibles doses a été utilisée avec succès dans le passé pour traiter les pneumonies, en particulier avant le début des effets des agents antimicrobiens. Les rapports cliniques indiquent une amélioration précoce des difficultés respiratoires en quelques heures et une réduction de la mortalité. Cependant, le traitement des pneumonies avec l'irradiation thoracique a été abandonnée avec l'arrivée des anti-bactérien synthétiques. Et le mécanisme par lequel l'irradiation thoracique, dans le passé, améliorait les symptômes liés à la pneumonie restent inconnus. Par ailleurs, Beaucoup d'études mettent en avant le rôle majeur des macrophages dans le maintien de l'homéostasie pulmonaire. De plus, nos travaux et d'autres ont bien montré le rôle important de l'irradiation dans la modulation de l'état d'activation des macrophages.

L'objectif de ce projet est de vérifier l'effet des faibles doses d'irradiation sur les sous-populations des macrophages pulmonaires en utilisant des modèles expérimentaux de pneumonie. Les résultats issus de ces expériences pourraient expliquer le mécanisme par lequel les faibles doses d'irradiation utilisées en clinique, dans le passé, sont efficaces dans le traitement des pneumonies, ce qui pourrait constituer une preuve de concept pour la mise en place du traitement des

pneumonies des patient atteint de covid19 avec les faibles doses d'irradiations. Afin de pouvoir comprendre la pathologie de pneumonie et proposer des solutions thérapeutiques, le recours à l'utilisation d'un modèle animal (organisme vivant entier) est nécessaire et indispensable du fait que la pneumonie est un processus physiopathologique complexe qui implique plusieurs composantes cellulaires et moléculaires.

Nous avons mis en place des stratégies d'expérimentation et d'observation afin de réduire au minimum la souffrance et la douleur des animaux. En effet, l'induction de la pneumonie sera pratiquée sous anesthésie générale afin de réduire au minimum la souffrance et l'angoisse des animaux. L'irradiation thoracique des souris sera également pratiquées sous anesthésie générale. Les souris seront hébergées en groupe pour minimiser le stress de l'isolement. L'environnement des animaux sera enrichi en permanence par du coton ou des nids en carton afin de diminuer leur angoisse et favoriser leur bien-être. Une pesée sera effectuée régulièrement. Les points limites seront strictement appliqués. Le nombre d'animaux sera adapté pour atteindre les objectifs du projet et réduire au minimum le nombre d'animaux. En effet, une analyse statistique à priori a été effectuée afin de calculer le nombre d'animaux nécessaires pour détecter des différences significatives et qui permet de réduire au minimum le nombre d'animaux, qui a été estimé au maximum à 374 souris.

15525 Comprendre comment le cerveau se développe, est organisé et fonctionne est fondamental en Neurosciences.

L'organisation et la morphologie des différentes cellules constituant le cerveau sont essentielles pour assurer correctement ces fonctions. Il est maintenant connu que les protéines de la Polarité Cellulaire et Planaire (PCP) contrôlent le développement du cerveau, son organisation, la morphologie des cellules et la mise en place des connexions entre elles. Au cours de ces dernières années il a été montré que certaines mutations des gènes codant pour ces protéines entraînaient l'apparition de maladies neuro-développementales.

Pour mieux étudier le rôle de ces protéines nous avons créé des modèles de souris transgéniques pour lesquelles certains des gènes codant pour des protéines de la PCP ont été modifiés. Nous souhaitons maintenant étudier l'anatomie des cerveaux ainsi que l'expression des protéines de la PCP en réalisant des études histologiques, histochimiques et immunohistologiques sur ces animaux.

Règle des 3R.

Remplacer Ce projet s'intègre dans un projet plus global combinant différents travaux de recherche complémentaires allant de l'étude biochimique ou bio moléculaire aux études *in vivo*. Beaucoup d'études « in-vitro » ont donc été effectuées sur des cellules en culture en amont de l'utilisation de lignées d'animaux pour limiter au maximum leur utilisation. Cependant le modèle animal reste essentiel pour comprendre comment ces protéines interagissent et peuvent modifier l'organisation d'un organe aussi complexe que le cerveau.

Réduire Pour ce projet nous utiliserons 11 lignées de souris transgéniques différentes et nous avons estimé le nombre total d'animaux nécessaire à ce projet à 876 souris sur 5 ans. Afin d'utiliser le nombre minimal d'animaux mais de garantir la validité scientifique et statistique des résultats, nous savons par expérience et en nous référant à la littérature que nos groupes d'animaux doivent être constitués à minima de 6 animaux pour les études histologiques et à 12 pour les études immunohistologiques.

Raffiner les animaux seront élevés en groupes sociaux de maximum 8 animaux par cage. Ils auront des éléments d'enrichissement de leur milieu pour leur permettre de mimer au mieux leur comportement naturel (nid de coton). Des points limites suffisamment précoces seront définis pour éviter des souffrances prolongées aux animaux et des mesures de soulagement seront mises en place pour soulager leur mal-être ou douleur (réhydratation, traitements en cas de bagarre)

15526 La cognition sociale regroupe l'ensemble des processus impliqués dans les interactions sociales, tel que l'évaluation des stimuli sociaux et la prise de décision flexible qui permet de s'adapter aux comportements des congénères. Notre équipe a clairement établi que la modulation par

l'acétylcholine de certains récepteurs au niveau des neurones d'une partie du cerveau, le cortex préfrontal, sous-tend et contrôle ces processus de décision lors de la cognition sociale sans affecter la motivation pour le contact social. Néanmoins, ces études ont été réalisées sur des souris modifiées pour ces récepteurs et qui présentent des taux d'acétylcholine supérieur à la normale. Confirmer et disséquer le rôle de l'acétylcholine dans le cortex préfrontal nécessite donc des méthodes plus directes de modulation de l'acétylcholine.

L'objectif de ce projet sera donc 1/ Contrôler précisément *in vivo* la libération d'acétylcholine dans le cortex préfrontal grâce à l'implantation d'une fibre optique intracérébrale. Cette approche utilisera des outils de contrôle de l'activité des neurones grâce à la lumière (optogénétique) chez des souris transgéniques permettant de cibler les neurones cholinergiques (animaux Chat-cre). 2/ Grâce à l'implantation de systèmes intracérébraux, mesurer *in vivo* la libération d'acétylcholine dans le cortex préfrontal en rapport avec les comportements sociaux. Ceci sera réalisé soit grâce à l'imagerie de la fluorescence du calcium des cellules cholinergiques ou via l'imagerie de senseurs à l'acétylcholine fluorescent exprimés dans les cellules du cortex frontal chez des animaux ChAT-Cre, soit de façon directe par des mesures de libération de l'acétylcholine. 3/ tester le mécanisme d'action de l'acétylcholine en réalisant des études de pharmacologie intracérébrale avec injections répétées intracérébrales de drogues. L'ensemble de ces méthodes nécessiteront des chirurgies du cerveau. Nous testerons donc ces méthodes lors de protocoles permettant de mesurer l'évaluation des stimuli sociaux et la prise de décision (test de l'interaction sociale) ou la motivation sociale (test des 3-chambres) sur 474 souris durant 5 ans.

Les objectifs scientifiques de ce projet, ne sont envisageables que chez l'animal car l'analyse de la prise de décision ne peut se faire que sur l'animal entier et vigile et ne peut être remplacé par des cultures de neurones ou des tranches de cerveau. Bien entendu, plusieurs méthodes sont utilisées pour limiter le nombre d'animaux et prendre en compte leur bien-être et leur potentielle souffrance. Lors de ce projet, les conditions d'élevage seront enrichies. Lors des procédures nous anticiperons les manipulations potentiellement douloureuses (chirurgies intracérébrales) où désagréables via une anesthésie et une analgésie adéquate, suivie d'une évaluation de la douleur du bien-être grâce à des grilles de score pendant au minimum une semaine après la procédure. En fonction du score, nous avons mis en place une stratégie de réduction de la douleur ainsi que des critères de points limites. La réduction du nombre d'animaux sera liée au fait que dès que cela sera possible, les animaux seront leur propre contrôle. Finalement des statistiques en analyse de variance seront réalisées avec un minimum de 12 animaux par conditions pour permettre une force statistique suffisante avec un nombre d'animaux réduit.

15527 La Broncho Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO) est une pathologie pulmonaire caractérisée par une obstruction des voies respiratoires due à une bronchite chronique ou un emphysème. La gravité de la BPCO vient du fait que l'obstruction des voies aériennes est non réversible, et qu'elle peut évoluer vers une insuffisance respiratoire à l'origine d'une diminution de la qualité de vie, d'un handicap et d'une mortalité. Le facteur majeur à l'origine de cette pathologie est la fumée de cigarette. D'autres facteurs sont incriminés dans le développement de la maladie parmi lesquels on trouve des poussières minérales (charbon, silice) ou inorganiques (coton), soit certains solvants lors d'exposition professionnelle.

Chez l'animal, l'exposition à la fumée de cigarette produit, comme chez l'homme, une infiltration de certaines cellules sanguines, les neutrophiles, dans le parenchyme pulmonaire. Ces neutrophiles sont responsables d'une inflammation qui va se développer, ils sont donc des marqueurs de l'inflammation.

Le projet consiste à évaluer la capacité de candidats médicaments à diminuer l'inflammation pulmonaire chez le rongeur induit par l'exposition à la fumée de cigarette, en diminuant le nombre de neutrophiles présents dans les poumons.

Le nombre prévisionnel d'animaux est de 600 souris et 300 rats sur 5 ans.

La conception de ce projet prend en compte la règle des 3R :

Remplacement dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez le rongeur car il n'existe pas de méthode de substitution (*in vitro* ou *in silico*) pour évaluer les effets d'une nouvelle molécule sur l'inflammation pulmonaire. Or, avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité, la toxicité et la pharmacocinétique d'un candidat médicament. A ce jour, le rat et la souris sont les espèces qui sont les plus adaptées à ce type de modèle d'étude.

Réduction Un nombre minimal et suffisant d'animaux par groupe est utilisé afin d'analyser de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et d'effectuer des analyses statistiques.

Raffinement dans ce projet, le raffinement sera obtenu par le recours à des procédures les moins invasives possibles, le suivi d'éventuels signes cliniques, la détermination des points limites, le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire, aide alimentaire et surveillance accrue lors de la phase d'exposition à la fumée de cigarette

15528 Les lésions nerveuses périphériques sont fréquentes et secondaires à différents traumatismes (plaies, brûlures, fractures, morsures). Leur gravité résulte dans les séquelles engendrées. La réparation chirurgicale des lésions nerveuses périphériques dépend de la perte de substance nerveuse. Lorsqu'elle est possible, la suture nerveuse directe (bout à bout) est le traitement de référence. Mais, lorsque le défaut nerveux est important et n'autorise pas une suture directe, deux techniques peuvent être utilisées soit la greffe nerveuse où le nerf est prélevé sur un autre site donneur, soit la greffe d'un tube de réparation entre les deux extrémités du nerf lésé. Ce tube de régénération sert de guide pour la repousse nerveuse.

Parallèlement, la régénération cellulaire est en plein essor avec l'utilisation de cellules souches mésenchymateuses. Ces cellules ont la capacité de se différencier en cellules d'une autre lignée (exemple en cellule de la peau, du cartilage, en cellule nerveuse, etc). Le tissu graisseux, abondant et accessible chez l'Homme, est riche en cellules souches mésenchymateuses. Les cellules souches mésenchymateuses issus de la graisse sous-cutanée sont déjà utilisées dans la réparation de la peau ou du cartilage.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'apport de cellules souches mésenchymateuses d'origine graisseuse associé à un tube de régénération à base de chitosan dans la réparation d'un défaut nerveux.

Le protocole expérimental se déroule en deux étapes

- Dans un premier temps, nous réaliserons une étude *ex vivo* permettant d'évaluer les interactions entre le tube de chitosan et les cellules souches mésenchymateuses de la graisse abdominale sous cutanée. Les cellules seront prélevées sur 3 rats.

Cette étape nous permettra de vérifier la survie des cellules au contact du tube de régénération.

- Dans un second temps, nous réaliserons une étude *in vivo* chez 40 rats. Un défaut nerveux de 15 mm sera réalisé chirurgicalement sous anesthésie générale, puis réparé dans le même temps opératoire selon deux techniques différentes représentant nos deux groupes comparatifs un premier groupe (x20) où le défaut nerveux sera reconstruit par un tube de régénération nerveuse seul, et un deuxième groupe (X20) où le défaut nerveux sera reconstruit par un tube de régénération comblé de cellules souches mésenchymateuses d'origine graisseuse.

Le but final de cette étude est de montrer une régénération nerveuse plus rapide et de meilleure qualité dans le groupe bénéficiant de cellules souches mésenchymateuses d'origine graisseuse comparativement au groupe qui en est dépourvu.

Le recours à l'animal est indispensable devant l'impossibilité de réaliser ce type de protocole de recherche chez l'Homme. Les alternatives *in vitro* sont inexistantes. Le rat est le plus utilisé dans l'étude de la régénération nerveuse pour ses analogies avec l'Homme. Les expérimentations se feront sur des rats mâles « Sprague-Dawley » âgés de 10 semaines (300g environ). Afin de respecter la règle des 3R (Réduire, Raffiner, Remplacer), le nombre d'animaux sera réduit à son minimum pour obtenir des résultats extrapolables à la population cible humaine. Après une période d'acclimatation en cage seul, l'animal sera opéré dans des règles d'asepsies strictes puis replacé

dans la même cage afin de limiter tout comportement agressif les uns envers les autres. Des méthodes de raffinement seront mise en place pour limiter le stress engendré (coton, serpentins, jouets). Un traitement antalgique adapté sera assuré, pendant et après opération, selon l'échelle de douleurs spécifiques « Rat Grimace Squalé » association de l'anesthésie générale et antalgiques après une induction et complété en fin d'intervention par une anesthésie locale du site opératoire. Un traitement antalgique sera mis en place en post-opératoire. Les conditions d'hébergement respecteront les normes en vigueur et la nourriture sera laissée libre.

Les paramètres d'évaluation terminaux (cliniques, électrophysiologiques et histologiques) seront réalisés en un seul temps permettant de limiter les explorations invasives répétées. L'évaluation sera effectuée sur 3 animaux par groupe à 15 jours, 7 animaux par groupe à deux mois et 10 animaux par groupe à six mois après opération. La procédure d'évaluation finale aboutissant à la mise à mort de l'animal par la nécessité des explorations histologiques (musculaire et tissu nerveux).

Le nombre total d'animaux nécessaire est de 47 3 rats pour l'étude *ex vivo*, 40 rats pour l'étude *in vivo* et 4 rats supplémentaires en cas d'échec (10% de la cohorte).

15529 Notre projet propose d'étudier les effets de la relaxine 3 dans le contrôle de la transmission sensorielle normale et pathologique. La relaxine-3 est synthétisée dans une région précise du cerveau appelée Nucleus Incertus mais elle est ensuite libérée dans plusieurs aires cérébrales où elle influence un grand nombre de fonctions physiologiques comme la prise de nourriture ou le stress. Nous avons montré lors d'expériences préliminaires que la relaxine-3 injectée dans le cerveau avait des effets analgésiques significatifs chez les souris douloureuses. Nous allons maintenant nous focaliser à préciser les voies nerveuses qui sont affectées par la Relaxine-3. Nous travaillerons d'abord sur des animaux contrôles puis sur un modèle inflammatoire et neuropathique chez la souris. Nous étudierons alors les modifications des voies nerveuses impliquées dans le rôle de la Relaxine-3, ainsi que les mécanismes de transmission de la douleur dans la moelle épinière. A l'aide d'enregistrements électrophysiologiques, nous chercherons à comprendre comment la Relaxine-3 modifie l'intégration du message neuronal au sein de l'amygdale, qui pourrait expliquer la diminution du comportement douloureux chez la souris.

Adéquation avec la règle des 3R.

Remplacer le recours au modèle animal est indispensable car ce projet demande une évaluation comportementale sur animal entier et aucun modèle *in vitro* ne peut répondre à cette étude.

Réduire Compte tenu de la variabilité dans les différentes expériences prévues, le nombre d'animaux est limité à 12 par groupe, ce qui permet d'obtenir des résultats exploitables en termes statistiques.

Raffiner Les animaux sont hébergés en cohorte, dans un milieu enrichi (matériel de nidification, bâton à ronger), et observés quotidiennement par l'expérimentateur ou une personne compétente. Les chirurgies seront toutes effectuées sous anesthésie et analgésie adéquates, et les animaux maintenus au chaud et surveillés jusqu'au réveil complet, avec traitement complémentaire analgésique.

Des points limites prédictifs ont été établis permettant d'interrompre les procédures et donc de soustraire l'animal à la souffrance.

Nombre total d'animaux utilisés dans ce projet : 972 souris

15530 *Mycobacterium abscessus* (Mabs) et *Mycobacterium avium* (Mavi) sont des mycobactéries pathogènes opportunistes responsables d'infections pulmonaires chroniques. La physiopathologie et le terrain prédisposant ces infections ne sont pas bien connus. Les antibiotiques disponibles pour les traiter sont limités (Mavi) voire quasiment inexistant (Mabs). Pour mieux comprendre l'impact de l'hôte sur le risque infectieux et évaluer de nouveaux traitements antibiotiques, des modèles précliniques sont indispensables. Les modèles murins développés jusqu'à présent sont très éloignés de la physiopathologie de la maladie bronchique humaine soit parce que les espèces murines choisies sont immunodéprimées, soit parce que l'infection se fait par voie intraveineuse. Notre projet consiste en l'évaluation de nouveaux modèles murins d'infection à Mabs et Mavi.

Dans les modèles actuels si des souris immunodéprimées ont été utilisées, c'est qu'il y a une élimination spontanée de l'infection chez les souris immunocompétentes. Pour contourner celle-ci, nous testerons dans un premier temps une infection des animaux par des mycobactéries encapsulées dans des billes d'alginate ou d'agar. Utilisée dans d'autres infections bactériennes, cette technique a permis de créer une infection chronique des animaux mimant ce qui est observé chez l'homme. Pour cette première étude nous utiliserons 696 souris.

Dans un deuxième temps, nous établirons une infection chronique en trouvant une lignée de souris capable de développer une infection mycobactérienne stable. Pour cela nous utiliserons des souris issues de croisements génétiques successifs appelées Collaborative Cross, qui, utilisées dans divers modèles infectieux, ont permis de conduire à un panel d'infections très différentes. Cette étude permettra à la fois de trouver un meilleur modèle pour l'étude de l'activité des antibiotiques mais aussi d'identifier des génotypes favorisant l'infection qui pourraient faire l'objet de confirmation chez l'homme dans un second temps. Pour cette deuxième étude nous utiliserons 480 animaux.

Au total, notre projet comporte 1176 animaux.

Conformité avec la règle des 3R

Remplacement notre projet s'inscrit en amont des études d'activités d'antibiotiques dans le cadre des infections bactériennes à Mabs et Mavi. Le modèle *in vivo* est indispensable avant une étude chez l'homme et ne peut être remplacé dans ce cas.

Réduction le nombre d'animaux utilisés a été réduit au minimum afin de nous permettre d'obtenir une puissance statistique fiable.

Raffinement il sera assuré par un hébergement conforme aux réglementations avec utilisation d'enrichissement (copeaux de cellulose), une utilisation d'anesthésiques adéquates, une observation matin et soir 7 jours/7 des animaux qui permettra d'apprécier si un changement dans le comportement habituel intervient.

15531 Le traitement ou la prévention des hémorragies chez les patients hémophiles A repose sur l'injection intraveineuse de facteur VIII (FVIII) exogène. La complication majeure de ce traitement est le développement d'une réponse immunitaire anti-FVIII aboutissant à la production d'anticorps de type IgG anti-FVIII capable de neutraliser l'activité pro-coagulante du FVIII thérapeutique. Ces anticorps sont appelés 'inhibiteur' du FVIII. La seule approche permettant une éradication de ces inhibiteurs consiste en l'injection quotidienne de fortes doses de FVIII sur des périodes pouvant atteindre plusieurs mois à plusieurs années. Outre son coût (supérieur à 200 k€ par an et par patient) et son extrême lourdeur, ce traitement, appelé « Induction de Tolérance Immunitaire » (ITI), n'est efficace que chez 60 à 80% des patients. L'apparition d'anticorps anti-FVIII inhibiteurs représente donc une impasse clinique et la prise en charge des patients avec inhibiteurs lors d'une intervention chirurgicale devient alors extrêmement compliquée.

Récemment, un anticorps monoclonal bispécifique nommé Emicizumab ou Hemlibra® a été développé. Emicizumab remplace le FVIII en reconnaissant à la fois le facteur IX activé et le facteur X, facilitant ainsi le clivage et l'activation du facteur X par le facteur IX activé. Cet anticorps est maintenant utilisé chez les patients avec et sans inhibiteurs. Toutefois, l'utilisation de certaines préparations thérapeutiques pro-coagulante (FEIBA) chez les patients hémophiles qui saignent malgré le traitement avec Emicizumab est compliquée par des accidents thrombotiques gravissimes. Il n'existe à ce jour pas d'antidote permettant d'inactiver Emicizumab, qui a une demi-vie de 3 semaines chez les patients. Chez les patients qui saignent malgré le traitement avec Emicizumab, les cliniciens sont confrontés au problème de ne pas pouvoir traiter les hémorragies sans risque de provoquer des thromboses potentiellement mortelles.

L'objectif de ce travail est de tester si l'injection d'enzyme Imlifidase ou IdeS, protéase dérivée de *Streptococcus pyogenes* capable de dégrader spécifiquement les IgG humaines, peut éliminer Emicizumab de la circulation des patients et permettre d'utiliser du FEIBA ou du facteur VII activé sans risquer d'induire une thrombose chez les patients. La validation et l'optimisation de cette approche seront obtenues chez la souris déficiente en FVIII, un modèle pré-clinique d'hémophilie A sévère. Le nombre total maximal de souris estimé pour ce projet est de 96 souris.

Les expériences sont planifiées en accord avec la règle des 3R afin de minimiser le nombre d'animaux remplacement, réduction et raffinement.

Remplacement Le projet fera appel à différents modèles expérimentaux chez la souris. En effet, seule une approche expérimentale *in vivo* permet de rendre compte de la complexité des systèmes biologiques. Toutefois, toute information obtenue par l'expérimentation animale sera immédiatement transposée à des systèmes *in vitro* pour analyses ultérieures.

Réduction Nous réduirons le nombre d'animaux par une analyse préalable poussée de la littérature scientifique pour maximiser les approches expérimentales. Des expériences *in vitro* seront menées en amont pour optimiser les méthodes et diminuer au maximum le nombre d'animaux par lots. Ainsi, des analyses de puissance seront-elles effectuées pour calculer le nombre minimum d'animaux par groupe tout en garantissant la solidité statistique des résultats.

Raffinement Les souris seront hébergées en accord avec les lois d'éthique européennes. Les animaux seront contrôlés quotidiennement pour évaluer et réduire au maximum tout risque de douleur. Les gestes susceptibles d'entraîner une douleur seront réalisés sous anesthésie gazeuse. Les conditions de vie seront améliorées au maximum (5 souris maximum par cage, ajout de nids végétaux et de tunnels en carton).

15532 Les méningiomes sont les tumeurs primitives du système nerveux les plus fréquentes chez les plus de 35 ans, ceux situés au niveau de la base du crâne étant histologiquement bénins mais un défi chirurgical pour le patient. Alors que lien entre hormones et méningiomes est connu depuis de nombreuses années, les liens moléculaires entre hormones et tumorigenèse méningée étaient jusqu'ici ignorés. Grâce à une étude de séquençage haut débit portant sur les méningiomes hormono-induits, nous avons pu déterminer des profils de mutations spécifiques des méningiomes hormono-induits, avec notamment une fréquence très importante de mutations activatrices du gène PIK3CA. Afin d'explorer de manière plus fine les liens entre hormones et tumorigenèse méningée, nous allons développer un modèle souris mimant les mutations activatrices de *Pik3ca* par activation conditionnelle par croisement avec souris à promoteur ciblant les méninges, en soumettant les souris à un traitement prolongé par progestatifs. Les souris seront comparées à des groupes contrôle par mutation du gène *Nf2* et par mutation du gène *Pik3ca* sans traitement hormonal, afin de préciser les apports spécifiques de la mutation et du traitement. Les souris seront analysées histologiquement et des tumeurs seront prélevées pour étudier la voie de signalisation *Pi3k-Akt-mTor* et développer des modèles cellulaires *in vitro*.

Ce modèle ne peut être remplacé par des modèles *in vitro* ou *in silico* du fait de la durée d'imprégnation hormonale prévue et de l'absence de lignées d'arachnoïde et de dure-mère caractérisées dans la littérature. Au cours du développement de ce modèle, nous avons réduit le nombre d'animaux à 15 à 30 par groupe (soit 180 animaux au total), le minimum requis pour observer des différences statistiquement significatives entre les groupes compte tenu de l'incidence attendue du phénotype, déterminée sur la base de précédents modèles. L'utilisation de souris génétiquement modifiées permet de limiter le nombre de procédures effectuées sur chaque animal. La seule procédure expérimentale fréquente sera l'implantation de pastilles hormonales, réalisée sous-cutané sous anesthésie générale par Isoflurane pour limiter la douleur et le stress des animaux.

15533 Les traitements anticancéreux traditionnels ne détruisent pas spécifiquement les cellules cancéreuses et ne préviennent pas les récives. Nous travaillons sur certaines chimiothérapies (anthracyclines ou oxaliplatine) capables d'activer le système immunitaire, et en particulier les lymphocytes T, en induisant la mort cellulaire immunogène. Une étude clinique rétrospective a mis en évidence qu'un polymorphisme affectant le gène *Fpr1*, impliqué dans l'efficacité de la chimiothérapie, est associé avec une réduction de la survie chez des patientes atteintes de cancer du sein, recevant des anthracyclines. Notre projet vise à déterminer le rôle des lymphocytes T en cas d'administration des traitements compensatoires des effets provoqués par l'absence de ce gène. Cette question ne peut être abordée qu'*in vivo* car il n'est pas possible d'étudier l'implication du système immunitaire sur le contrôle de la croissance tumorale dans des systèmes *in vitro*. Nous

souhaiterons effectuer cette étude en utilisant des souris immunocompétentes (n. 960) et des souris transgéniques (n. 960) accessibles dans le commerce et qui sont viables, fertiles, de taille normale et ne présentent pas d'anomalies physiques ou comportementales. Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des expérimentations (expériences de croissance tumorale) a été mis au point afin de respecter les exigences de remplacement, réduction et raffinement pour permettre une interprétation fiable des résultats dans le respect du bien-être animal. Les expérimentations seront regroupées au maximum afin de réduire le nombre d'animaux contrôles. L'étude sera arrêtée si la procédure initiale invalide l'hypothèse de travail. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et adaptées en accord avec le personnel de l'animalerie (les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum; le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification et/ou tunnels en cartons). Les animaux seront observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être. La mise en place d'une grille de suivi strict des points limites permettra d'éviter au maximum le stress et/ou la douleur au cours de l'expérimentation. De plus, le personnel impliqué dans ce projet est qualifié sur le plan technique et formé en continu sur les pratiques d'expérimentation animale. Il assure également une veille scientifique continue, évitant toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature.

15534 Le décollement de rétine correspond à une séparation entre la rétine neurosensorielle et l'épithélium pigmentaire. On distingue trois formes cliniques rhégmato-gène, la plus fréquente, tractionnelle et exsudative. Son incidence est estimée à 1 pour 10000 habitants par an, soit environ 6000 nouveaux cas par an. Il s'agit d'une affection potentiellement cécitante nécessitant un traitement chirurgical en urgence. Ce traitement vise à obturer la déchirure et à créer une cicatrice étanche empêchant le passage du liquide sous-rétinien, le pompage effectué par l'épithélium pigmentaire permettant alors de réappliquer la rétine. Actuellement, grâce à l'amélioration des techniques chirurgicales et les progrès de l'instrumentation, le taux de succès anatomique à la première intervention s'élève à plus de 80%. Cependant, malgré une réapplication rétinienne totale, la récupération visuelle est parfois limitée, principalement en raison de l'apoptose des photorécepteurs. Aucun traitement préventif n'existe à l'heure actuelle. Notre étude propose d'étudier le rôle protecteur de molécules anti-inflammatoires contre la dégénérescence de la rétine décollée. Celle-ci résulte d'une interaction complexe entre différents types cellulaires juxtaposés et ne peut être modélisée dans des systèmes *in vitro*. La séparation entre la rétine neurosensorielle et l'épithélium pigmentaire peut être expérimentalement induite chez le rongeur par la réalisation d'une injection sous-rétinienne, qui représente actuellement le modèle le plus utilisé pour étudier le décollement de rétine.

Cette étude nécessitera l'utilisation de 2040 animaux.

Conformément à la « règle des 3R » décrite au 2° de l'article R214-105, nous avons limité au maximum leur nombre nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement interprétables. Les animaux seront examinés quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié de l'animalerie et seront hébergés dans les conditions conformes à la réglementation. Ils bénéficieront d'une anesthésie générale lors de la réalisation de l'injection sous rétinienne qui induira le décollement de rétine.

15535 Les muscles squelettiques sont essentiels à la locomotion, à la thermorégulation et aux activités sédentaires vitales, comme la respiration et la déglutition. Plusieurs myopathies restent incurables entraînant une destruction des cellules musculaires, les myocytes, et à une réduction de la masse musculaire. Ces myopathies sont souvent mortelles. Les cellules souches musculaires offrent une voie prometteuse pour la thérapie cellulaire en raison de leur extraordinaire potentiel de régénération des myocytes et donc de réparation des muscles. Le microenvironnement est essentiel pour le maintien des cellules souches. Il peut être de composition cellulaire ou non cellulaire comme les facteurs de croissance sécrétés et les protéines de la matrice extracellulaire. Bien que plusieurs voies de signalisation moléculaire, dont Notch, aient été identifiées pour maintenir les cellules souches musculaires, la composition et la source de ces molécules restent largement inconnues. L'identification de ces molécules et leurs modes d'interaction est un défi

majeur et une condition préalable à l'utilisation des cellules souches musculaires en médecine régénérative.

En se concentrant sur la voie de signalisation Notch, le but de ce projet est de disséquer les voies de signalisation qui contrôlent l'établissement, l'entretien et l'activation des cellules souches musculaires. Pour cela, nous utilisons une approche génétique qui permet la manipulation de cette voie de signalisation directement dans l'environnement physiologique des cellules. Bien que plusieurs équipes, dont la nôtre, développent des approches *in vitro* pour générer et maintenir des cellules souches musculaires dormantes (cellules non différenciées et non proliférantes), l'efficacité est encore faible et les cellules présentent des différences significatives par rapport à leurs homologues *in vivo*.

Pour nos études, nous utiliserons 1490 souris. Tout au long de nos procédures, la règle des 3R sera respectée. Nous utiliserons le nombre d'animaux nécessaire pour avoir une bonne puissance de l'étude et des réponses aux questions posées. Afin d'affiner les procédures, nous avons établi des points limites pour chaque procédure. Un examen clinique des animaux sera effectué quotidiennement. Tout signe témoignant d'une mauvaise tolérance au traitement « perte de poids, souffrance, apathie, déshydratation » des animaux conduira à l'interruption de la procédure.

15536 Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) représentent la seconde cause de mortalité dans le monde et la première cause d'handicap. Ces AVC peuvent être ischémiques, causés par un thrombus, ou hémorragiques et ne peuvent être distingués uniquement sur la base des symptômes du patient. Une imagerie diagnostique doit être réalisée avant toute décision thérapeutique, puisque le traitement diffère fortement entre les deux formes principales d'AVC. De plus, cette démarche doit être effectuée rapidement puisqu'en moyenne une victime d'AVC perd 2 millions de neurones par minute. L'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) et la tomographie X (CT) sont utilisées en routine clinique. Malgré leurs immenses avantages, ces deux technologies ne sont pas accessibles suffisamment rapidement partout dans le monde

L'échographie est une technologie très flexible et portable. Malheureusement, sa résolution est insuffisante lorsqu'utilisée à travers la paroi du crâne puisque les fréquences ultrasonores exploitées doivent être abaissées (autour de 1-2 MHz). Nous avons récemment démontré que l'échographie super-résolue, par microscopie à localisation ultrasonore (ULM), permet de contourner cette limite et nous permettrait de réaliser une angiographie avec une résolution d'environ 50 micromètres à travers le crâne. Le projet a pour objectif de créer un appareil d'échographie 3D super-résolu qui sera transféré en clinique en fin de projet, mais il est d'abord essentiel que l'on identifie les signes distincts permettant d'identifier les différents types AVC sur ce type d'image.

Le but de ce projet est donc de distinguer les AVC ischémiques et hémorragiques sur des échographies super-résolues du cerveau de rat. Pour cela, la nouvelle technique d'imagerie sera évaluée sur deux modèles connus d'AVC sur l'animal et comparée à l'IRM, ainsi qu'au micro-CT.

La grande originalité de ce projet est le caractère tridimensionnel de l'échographie super-résolue puisque cela est essentiel pour rendre l'imagerie ultrasonore rapide, précise, mais également indépendante de l'utilisateur. En effet, le but ultime étant de transférer cet appareil dans les cliniques et les ambulances, une angiographie du cerveau doit pouvoir être effectuée sans la présence du radiologue et ne peut donc compter sur une phase de placement anatomique.

Pour ce faire, le projet nécessitera l'étude du réseau vasculaire cérébral de 40 rats Sprague-Dawley adulte (10 à 12 semaines) au travers de 8 étapes, l'échographie super-résolue (n=40), l'induction du modèle ischémique (n=10), l'induction du modèle hémorragique (n=10), l'IRM (n=40), ainsi que des mesures comportementales.

Le projet s'inscrit pleinement dans la démarche des 3R pour le bien-être des animaux suivant le décret n° 2013-118 et les arrêtés du 1er février 2013. Il nous est impossible de remplacer l'animal car nous avons besoin d'un système biologique intègre pour étudier le réseau vasculaire cérébral et de l'impact des AVC. Le nombre d'animaux a été réduit au minimum par l'analyse statistique préalable sur la taille des groupes requise pour réaliser l'étude avec significativité. Aussi, les

animaux seront utilisés comme leur propre contrôle. Bien que le cœur du projet consiste au développement d'une technologie non invasive des chirurgies seront nécessaire pour induire des AVC. Ces procédures seront réalisées sous anesthésie générale associée à une analgésie adéquate afin d'abolir toute douleur et souffrance animale. Les conditions d'hébergement incluant l'utilisation de litière ainsi que de systèmes d'enrichissement avec accès illimité à la boisson et la nourriture devront assurer le bien-être animal.

15537 Une des causes majeures de la mort des cellules cardiaques lors d'un infarctus du myocarde (c'est-à-dire lors de l'arrêt de la circulation sanguine cardiaque) est un dysfonctionnement de composants des cellules, appelés mitochondries. Ces dernières sont des centrales énergétiques qui utilisent l'oxygène que nous respirons pour produire 90% de l'énergie dont nous avons besoin quotidiennement. Protéger les mitochondries d'un cœur ayant subi un infarctus s'avère donc être une stratégie thérapeutique majeure.

La protéine translocatrice (ou TSPO) est présente dans la membrane externe des mitochondries. Sa principale fonction est de contribuer à la synthèse des hormones stéroïdes à partir du cholestérol et elle est donc très concentrée dans les organes qui les synthétisent. Elle participe également à la synthèse des globules rouges. La TSPO joue donc un rôle majeur dans le métabolisme cellulaire mais est aussi présente dans le cœur et dans cet organe son rôle reste à ce jour inconnu.

Cependant, nous avons montré, dans des travaux précédents, que des molécules se fixant sur la TSPO réduisent la taille d'un infarctus expérimental en limitant l'accumulation de cholestérol dans la mitochondrie et en inhibant la formation de substances toxiques dérivées du cholestérol, les oxystérols. Ces résultats établissent un lien entre l'accumulation de cholestérol dans la mitochondrie cardiaque et l'apparition de lésions cardiaque lors d'un infarctus et font de la protéine TSPO une cible intéressante pour le développement de molécules cardioprotectrices.

L'absence de cette protéine dans la cellule a longtemps été considérée comme létale mais très récemment, une équipe canadienne a réussi à générer des rats génétiquement modifiés viables ne possédant pas cette protéine (dénommés TSPO^{-/-}). C'est un modèle animal important qui va permettre d'étudier plus facilement le rôle de cette protéine dans la cellule.

L'objectif de ce projet est d'étudier l'impact de cette délétion sur la fonction cardiaque, sur le métabolisme des glucides, des lipides, des hormones stéroïdes et sur la formation des globules rouges. Dans une première partie, nous comparerons la fonction cardiaque et le métabolisme chez des animaux TSPO^{-/-} par rapport à des animaux contrôles (TSPO^{+/+}) au cours de leur développement entre l'âge de 8 semaines (jeunes adultes) et d'1 an et demi (vieux animaux). Une seconde partie de l'étude caractérisera l'effet de la délétion TSPO sur la formation des globules rouges. Ce projet qui prévoit au cours du temps l'évaluation de paramètres physiologiques cardiaques et de modifications métaboliques induits par la suppression de la protéine TSPO nécessite l'utilisation du modèle animal TSPO^{-/-} qui seul permettra de répondre aux objectifs de cette étude.

Dans ce projet, nous utiliserons une colonie de rats TSPO^{-/-} développée au laboratoire. Au total, nous emploierons 40 rats. Les animaux seront hébergés dans une animalerie conventionnelle. Pendant leur séjour, les rats auront à leur disposition des balles de coton, des feuilles de papier pour jouer, des huttes et des tunnels en carton pour se cacher et des baguettes de bois à ronger. Les protocoles expérimentaux ne devraient pas induire de modifications notables de l'état de nos animaux ni de douleurs particulières. Afin de réduire au maximum le nombre de rats utilisés, 3 des procédures expérimentales utiliseront les mêmes animaux.

15538 Les maladies du système nerveux représentent plus de 35% de la totalité des maladies en Europe et ce chiffre est en augmentation constante en partie dû à l'allongement de la durée de vie. Toute atteinte au système nerveux central (SNC) conduit à des pertes de fonctions vitales telles que la vision dans le cas du glaucome, cognitifs dans le cas de la maladie d'Alzheimer ou la motricité dans les cas de sclérose en plaque ou lors de lésions de la moelle épinière. Les patients doivent endurer une perte irréversible de ces fonctions puisqu'aujourd'hui encore aucun traitement ne permet de promouvoir la reformation d'un circuit fonctionnel. La compréhension des mécanismes moléculaires

liés à la mort et la croissance des neurones représente donc un défi majeur en biologie dans le but de développer des stratégies thérapeutiques innovantes.

La principale cause expliquant la perte fonctionnelle est qu'à la différence des neurones du système nerveux périphérique (SNP), les neurones du SNC ne peuvent pas régénérer leurs axones après une lésion. Même si certaines molécules ont déjà pu être mises en évidence, elles sont encore loin de permettre une guérison complète et sont de très mauvaises cibles pour un développement thérapeutique. Notre équipe a pour but d'identifier de nouveaux mécanismes moléculaires qui permettront de découvrir de nouvelles cibles qui protégeront les neurones de la mort et permettront leurs repoussent.

Pour atteindre ces objectifs, les modèles murins sont essentiels car i) les paradigmes de lésion chez la souris sont les mêmes que chez l'humain, ii) un très grand nombre de lignées de souris transgéniques sont déjà disponibles pour nos recherches et iii) les mécanismes de croissance nécessitent l'intervention de différents acteurs et ne peuvent être mimés efficacement dans un système unicellulaire ou modélisé. Nous ne pouvons donc remplacer les souris. Enfin iv) tous les modèles transgéniques nécessaires à notre projet sont disponibles chez la souris. Dans ce projet, nous aurons recours à 3130 souris sur une durée de 5ans. Afin de réduire le nombre d'animaux nous testerons d'abord les molécules d'intérêt dans ces cultures de tissus. Ainsi avec un animal nous pourrons tester jusqu'à 6 candidats. De plus nous utiliserons au maximum les mêmes animaux contrôles lorsque nous testerons les candidats potentiels favorisant la neuroprotection et la repousse axonale. Nous utiliserons les mêmes animaux pour répondre à un maximum de questions. Par exemple nous étudierons la repousse axonale et la survie neuronale en parallèle. Ainsi un même animal répondra à plusieurs questions sans subir d'intervention additionnelle. Nous serons particulièrement attentifs au bien-être animal puisque chacune des procédures décrites ici ont été préalablement discutées avec un vétérinaire et incluent des protocoles afin de minimiser la douleur ou l'angoisse des animaux.

15539 Salmonella est une bactérie pathogène importante en santé publique. Elle est responsable, suivant le sérotype et en fonction de l'hôte infecté, d'infections systémiques létales, de gastroentérites ou encore d'un portage asymptomatique. Chez l'homme, la fièvre typhoïde touche encore 22 millions de personnes chaque année et on estime à 1,3 milliards le nombre de cas de gastroentérites à Salmonella chaque année dans le monde. Comprendre les mécanismes d'interactions d'un pathogène avec son hôte est indispensable au développement de méthodes de prophylaxie ou de thérapeutiques. L'objectif de ce projet est de déterminer la cinétique spatio-temporelle d'expression de 9 facteurs de virulence de Salmonella au cours de l'infection. Trois modèles murins reproduisant chacun un des trois syndromes ci-dessus seront utilisés. En fonction du modèle, la durée d'expérimentation varie entre 5 et 12 jours post-inoculation. Le nombre de souris à utiliser par expérimentation est fixé en considérant une puissance de test statistique de 80% au risque alpha de $p=0.05$.

Ce projet satisfait le principe des 3R

Remplacement l'objectif du projet est de déterminer la cinétique d'expression de gènes de virulence en cours d'infection, le recours à l'animal est donc nécessaire

Réduction une caractérisation préalable des gènes est réalisée *in vitro* pour permettre la sélection des gènes les plus pertinents et ainsi réduire le recours à l'animal.

Raffinement les souris disposeront de feuilles de sopalin, cet enrichissement n'interférant pas avec l'étude. L'expérience acquise sur les trois modèles murins permet de définir un point limite approprié. Nous estimons à 3515 le nombre d'animaux requis pour ce projet.

15540 En France, la sclérose en plaques (SEP) touche plus de 100 000 personnes et représente la 2ème cause de handicap chez le jeune adulte. Elle se caractérise par une atteinte de la substance blanche (myéline) du système nerveux central source de handicap moteur et cognitif. Le développement de méthodes d'imagerie de la myéline est un enjeu majeur pour l'évaluation de nouveaux traitements. Ce projet vient en complément d'un projet en cours qui porte sur le « développement de nouveaux

radiotraceurs pour l'imagerie cérébrale en tomographie par émission de positons (TEP) » et mis en place par notre collaborateur sur un site partenaire. Il utilise un modèle simplifié de sclérose en plaques pour développer et évaluer de nouvelles méthodes d'imagerie de la démyélinisation. Notre apport dans ce projet est l'évaluation de nouvelles approches d'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) très haut champ (11.7T) et permettant de mieux caractériser la myéline, et son éventuelle régénération. Une validation *in vivo* est nécessaire afin de déterminer la qualité des informations apportées par ces techniques. Il s'agit d'un projet préliminaire d'une durée de 2 ans permettant de calibrer le protocole d'acquisition et d'évaluer le potentiel des méthodes d'IRM sur animal anesthésié.

Une première procédure développera le projet sur le rat qui présente un gros cerveau facilitant la mise œuvre de l'IRM. En cas de succès, le passage à la souris sera envisagé dans une deuxième procédure.

Une phase de mise au point du protocole d'acquisition IRM concernera 4 animaux sains. La deuxième phase de la procédure portera sur le suivi longitudinal de 8 animaux avec lésion démyélinisante.

La deuxième procédure sur souris (12 animaux, 4 sains 8 modèles) suivra, si elle a lieu, la même démarche.

Application des 3R

Remplacer Il s'agit de mettre au point un protocole expérimental et de tester de nouvelles méthodes d'acquisition en IRM. Leurs aspects techniques seront validés *in vitro* avant d'être appliqué à l'animal. Nous commencerons nos expérimentations sur rats afin de s'assurer d'une amplitude de signal suffisante (qui est proportionnel à la zone observée, le rat présente un volume cérébral significativement plus grand que la souris). Le passage à la souris se fera dans une deuxième phase en cas de succès chez le rat, afin d'envisager par la suite un travail sur d'autres modèles plus proches de la maladie humaine et obtenus uniquement chez la souris.

Réduire 4 animaux sains sont prévus pour la mise en place du protocole *in vivo* et pourront être réutilisés, sur avis vétérinaire. 8 animaux avec une lésion de la matière blanche seront utilisés en imagerie afin de pouvoir tirer des conclusions à minima selon des tests non paramétriques sur la variabilité et reproductibilité des mesures. La faisabilité chez la souris (mêmes effectifs) sera envisagée seulement en cas de succès chez le rat.

Raffiner Des mesures de raffinement seront prises au cours du suivi afin de réduire le léger stress engendré par les examens IRM répétés. Ces mesures seront réalisées sous anesthésie générale, afin que l'animal ne bouge pas (une nécessité pour les examens IRM) et permettra de diminuer le stress induit par le bruit des machines, et obtenir des résultats fiables. Certaines séquences IRM peuvent avoir un niveau sonore important des mesures seront prises comme la fixation d'un morceau de cire malléable sur les barres d'oreilles pour préserver l'ouïe des animaux.

15541 Le réchauffement climatique en cours induit des perturbations aux niveaux des écosystèmes aquatiques en modifiant sensiblement les paramètres physico-chimiques des eaux. Les poissons, qui doivent s'adapter en permanence à leur environnement, sont particulièrement sensibles aux variations de qualité de l'eau. Les élevages de truites arc-en-ciel, une espèce majeure d'eau douce en France, peuvent être fortement impactés par des teneurs en oxygène et/ou des températures d'eau non optimales et ce, même si les variations semblent minimales. Des solutions techniques existent pour maîtriser ces paramètres, mais elles sont coûteuses et ne peuvent pas forcément être mises en œuvre dans toutes les piscicultures.

Le projet a pour objectif général d'étudier la possibilité de sélectionner des truites destinées à l'élevage sur leurs capacités génétiques à résister à des teneurs en oxygène ou à des températures d'eau non optimales, en ciblant les individus présentant les meilleures capacités d'adaptation au sein d'une population.

La stratégie déployée consistera à placer des groupes d'individus dans des conditions d'élevage présentant des teneurs en oxygène réduites (hypoxie) ou des températures supérieures aux valeurs optimales (hyperthermie) afin de tester leur résistance. Il s'agira de classer les individus selon la

température ou la teneur en oxygène provoquant une perte d'équilibre, caractérisée par l'arrêt de nage du poisson et son basculement sur le côté, de plus de 5 secondes. Le profil génétique de l'ensemble des individus soumis aux essais sera réalisé au terme des procédures afin de déterminer le caractère héréditaire de la résistance à chaque paramètre testé. Les frères-sœurs des individus testés et présentant un potentiel de résistance intéressant pourront être sélectionnés au sein des populations commerciales. Les retombées à terme sont de pouvoir sélectionner des poissons ayant une physiologie performante pouvant s'adapter aux changements des conditions d'élevage liés aux modifications climatiques globales.

Le présent projet porte sur la réalisation de 3 tests de résistance à des conditions hypoxiques et 2 tests de résistance à des conditions hyperthermiques, pour respectivement 3 et 2 lots de truites arc-en-ciel issues des cheptels de 3 sélectionneurs français. Le nombre de poissons nécessaire sera de 6700 au total. Ce nombre est calculé sur la base des plans expérimentaux en place en sélection génétique et limité au seuil de la pertinence statistique et scientifique.

Il n'y a pas d'alternative *in vitro* connue pour évaluer la capacité d'adaptation d'un poisson à un environnement stressant. Par ailleurs, les mesures de résistance aux stress aigus doivent être individuelles pour permettre une sélection sur les frères/sœurs des poissons testés. Chaque stress aigu est de courte durée (environ 10h). Le point limite fixé pour ces tests est la perte d'équilibre des poissons. Ceux-ci seront surveillés en continu et retirés du bassin de test dès que la perte d'équilibre durera plus de 5 secondes. A l'issue des expérimentations, l'ensemble des poissons sera sédaté puis euthanasié avec une dose létale d'anesthésiant.

15542 En France, la sclérose en plaques (SEP) touche plus de 100 000 personnes et représente la 2ème cause de handicap chez le jeune adulte. Elle se caractérise par une atteinte de la substance blanche (myéline) du système nerveux central source de handicap moteur et cognitif. Le développement de méthodes d'imagerie de la myéline est un enjeu majeur pour l'évaluation de nouveaux traitements. Ce projet vient en complément d'un projet en cours qui porte sur le « développement de nouveaux radiotraceurs pour l'imagerie cérébrale en tomographie par émission de positons (TEP) » et mis en place par notre collaborateur sur un site partenaire. Il utilise un modèle simplifié de sclérose en plaques pour développer et évaluer de nouvelles méthodes d'imagerie de la démyélinisation. Notre apport dans ce projet est l'évaluation de nouvelles approches d'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) très haut champ (11.7T) et permettant de mieux caractériser la myéline, et son éventuelle régénération. Une validation *in vivo* est nécessaire afin de déterminer la qualité des informations apportées par ces techniques. Il s'agit d'un projet préliminaire d'une durée de 2 ans permettant de calibrer le protocole d'acquisition et d'évaluer le potentiel des méthodes d'IRM sur animal anesthésié.

Une première procédure développera le projet sur le rat qui présente un gros cerveau facilitant la mise œuvre de l'IRM. En cas de succès, le passage à la souris sera envisagé dans une deuxième procédure.

Une phase de mise au point du protocole d'acquisition IRM concernera 4 animaux sains. La deuxième phase de la procédure portera sur le suivi longitudinal de 8 animaux avec lésion démyélinisante.

La deuxième procédure sur souris (12 animaux, 4 sains 8 modèles) suivra, si elle a lieu, la même démarche.

Application des 3R

Remplacer Il s'agit de mettre au point un protocole expérimental et de tester de nouvelles méthodes d'acquisition en IRM. Leurs aspects techniques seront validés *in vitro* avant d'être appliqué à l'animal. Nous commencerons nos expérimentations sur rats afin de s'assurer d'une amplitude de signal suffisante (qui est proportionnel à la zone observée, le rat présente un volume cérébral significativement plus grand que la souris). Le passage à la souris se fera dans une deuxième phase en cas de succès chez le rat, afin d'envisager par la suite un travail sur d'autres modèles plus proches de la maladie humaine et obtenus uniquement chez la souris.

Réduire 4 animaux sains sont prévus pour la mise en place du protocole *in vivo* et pourront être réutilisés, sur avis vétérinaire. 8 animaux avec une lésion de la matière blanche seront utilisés en imagerie afin de pouvoir tirer des conclusions à minima selon des tests non paramétriques sur la variabilité et reproductibilité des mesures. La faisabilité chez la souris (mêmes effectifs) sera envisagée seulement en cas de succès chez le rat.

Raffiner Des mesures de raffinement seront prises au cours du suivi afin de réduire le léger stress engendré par les examens IRM répétés. Ces mesures seront réalisées sous anesthésie générale, afin que l'animal ne bouge pas (une nécessité pour les examens IRM) et permettra de diminuer le stress induit par le bruit des machines, et obtenir des résultats fiables. Certaines séquences IRM peuvent avoir un niveau sonore important des mesures seront prises comme la fixation d'un morceau de cire malléable sur les barres d'oreilles pour préserver l'ouïe des animaux.

15543 Malgré un traitement par irradiation du cerveau en son entier, le traitement des métastases cérébrales reste malheureusement à caractère palliatif puisqu'il consiste en une prise en charge non spécifique et tardive de la maladie. La problématique réside donc dans la nécessité d'apporter un traitement plus spécifique des métastases cérébrales en tenant compte notamment de l'hétérogénéité interpatient. Il serait donc intéressant d'évaluer le potentiel thérapeutique d'une adaptation des protocoles de radiothérapie en fonction des paramètres biologiques de la tumeur. Un des paramètres biologiques important dans la réponse thérapeutique est l'hypoxie. En effet, celle-ci est connue pour induire une résistance des cellules tumorales à la radiothérapie. Adapter spatialement et quantitativement la radiothérapie en fonction de la concentration en oxygène retrouvée au niveau de la tumeur apparaît ainsi comme ayant un fort potentiel thérapeutique. L'imagerie multimodale et notamment fonctionnelle apparaît ici comme étant un outil très intéressant pour la caractérisation spatiale de l'hypoxie et ainsi permettre une adaptation spatiale et quantitative de la radiothérapie externe. Nous proposons donc, dans ce projet, dans un premier temps, de caractériser par imagerie le niveau d'hypoxie de différents modèles précliniques de métastases cérébrales de cancers primaires que l'on retrouve le plus fréquemment chez le patient, à savoir le cancer du poumon et du sein. Cette caractérisation s'effectuera par imagerie IRM. Dans un second temps, nous utiliserons cette caractérisation spatiale et quantitative de l'hypoxie obtenues en imagerie pour adapter spatialement et quantitativement les doses de radiothérapie externe et ainsi évaluer l'intérêt thérapeutique de cette approche plus personnalisée par rapport au traitement standard de radiothérapie du cerveau entier. L'évaluation de l'efficacité de cette nouvelle approche thérapeutique se fera par un suivi hebdomadaire en imagerie IRM mais aussi 3 jours après les traitements en imagerie TEP. Cette caractérisation de l'efficacité de traitement en imagerie sera combinée à une étude de survie ainsi qu'à des études immunohistologiques. Concernant l'aspect « remplacement », ce projet ne peut pas s'effectuer sur des modèles de remplacement *in vitro* ou *in silico* car les tumeurs sont connues pour être multicompartimentales, c'est-à-dire qu'au-delà du simple compartiment de la cellule tumorale existent les compartiments mentionnés précédemment. L'utilisation des modèles *in vivo* complets intégrant tous les compartiments des tumeurs cérébrales ainsi que le fonctionnement global de l'organisme reste indispensable. Le choix d'animaux immunodéprimés (rats nude) pour notre projet, se justifie par l'utilisation de cellules humaines de métastases cérébrales.

Pour mener à bien ce projet, 10 animaux par groupes seront nécessaires et ceci pour les 3 groupes de traitement (groupes Contrôle, irradiation du cerveau en son entier et radiothérapie adaptée à l'hypoxie), pour les 4 modèles de métastases cérébrales (2 modèles de cancer primaire du poumon et 2 modèles de cancer primaire du sein) portant le nombre de rat pour cette partie à $10 \times 3 \times 4 = 120$. De plus, 6 animaux seront nécessaires pour des études immunohistologiques pour confirmer et approfondir les résultats d'imagerie portant le nombre total de rats nécessaires à $120 + 6 \times 3 \times 4 = 192$ rats nude.

La caractérisation de l'efficacité des traitements de radiothérapie sur les modèles de métastases cérébrales utilisera l'imagerie biomédicale et notamment la TEP c'est pourquoi elle sera réalisée sur des rats au regard de la faible résolution spatiale de la TEP peu compatible avec l'imagerie du cerveau de souris. Enfin, l'utilisation des méthodes d'imagerie non invasive se conforme à la

réglementation en vigueur dans le respect de la réduction du nombre d'animaux car permettant de suivre à différents temps l'évolution de la tumeur. Enfin, concernant l'aspect « raffinement », les différents protocoles ont été pensés de manière à limiter au maximum la souffrance animale et ainsi augmenter le bien-être animal avec par exemple des applications de xylocaïne après l'acte chirurgical ou l'utilisation d'anesthésie pour les acquisitions d'imagerie médicale afin d'éviter un maximum le stress de l'animal.

L'utilisation de l'imagerie multimodale apporte un gain important en terme de réduction du nombre d'animaux puisque chaque compartiment peut-être évalué à l'échelle de chaque individu.

15544 L'inflammation joue un rôle essentiel dans la pathogenèse de nombreuses maladies cérébrales, tels que les accidents vasculaires cérébraux (AVC), la maladie d'Alzheimer, ou la sclérose en plaques. Cette inflammation se caractérise, au niveau des vaisseaux sanguins par l'expression de molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales. L'imagerie moléculaire est une technique émergente, non-invasive, qui permet de visualiser l'inflammation à l'IRM, à l'aide d'anticorps dirigé contre une molécule d'adhésion (comme VCAM-1 ou la P-sélectine), conjugués à des microparticules d'oxyde de fer (MPIOs), dont les propriétés superparamagnétiques permettent une grande sensibilité du signal à l'IRM. Ces MPIO couplées à des anticorps dirigés contre les antigènes de protéines d'intérêt ont permis d'observer l'inflammation sur des modèles murin d'accident ischémique transitoire, d'AVC ischémique et hémorragique ou encore de sclérose en plaques. Mais malgré leur nette efficacité dans les études précliniques, les MPIO sont constituées de matériaux inertes et non biocompatibles, ce qui exclut leur utilisation chez l'Homme.

L'objectif de ce projet est donc de tester *in vivo*, un agent de contraste permettant de révéler l'inflammation à l'IRM, et qui soit biocompatible pour permettre une application clinique.

Cette étude basée sur l'expérimentation animale prend en compte le bien-être animal et les pratiques éthiques, et répond à la règle des 3 R (remplacer, réduire, raffiner) comme décrit ci-dessous

La souris est une des espèces animales les plus étudiées dans le domaine de l'inflammation cérébrale. L'anatomie et la physiologie de la circulation cérébrale sont donc parfaitement connues. L'ensemble des connaissances et des acquis dont nous disposons au laboratoire et dans la littérature rend cette espèce particulièrement intéressante pour étudier l'inflammation.

Notre projet ne nous permet pas d'utiliser d'autres moyens que de tester notre modèle chez l'animal anesthésié.

Nous avons souscrit au principe de remplacement en sélectionnant pour notre étude le modèle présentant le meilleur compromis entre une haute pertinence et une faible sensibilité. Dans ce projet, 180 souris seront nécessaires pour l'évaluation de la biocompatibilité de l'agent de contraste, 120 souris seront nécessaires pour l'étude de l'agent de contraste dans le modèle d'inflammation cérébrale par injection de lipopolysaccharides

Les animaux seront maintenus anesthésiés durant la chirurgie et tout au long de l'imagerie, puis seront euthanasiés en conformité avec la loi. Les mesures pour réduire au maximum toute forme d'inconfort et de souffrance sont, outre celles mentionnées cidessus, le suivi strict et rapproché des animaux, l'hébergement en petits groupes sociaux stables (n=5) avec un enrichissement minimum (un rouleau cartonné + une feuille de papier essuie-tout), et la manipulation uniquement par des personnels expérimentés. Les animaux seront maintenus dans des conditions optimales d'hébergement, dans un environnement stabilisé en température (21°), hygrométrie (55%), luminosité (100 lux), et durée du cycle de lumière (12h/12h) et sont sous l'attention quotidienne du personnel de l'animalerie.

Mots clefs inflammation cérébrale imagerie moléculaire biomarqueurs.

15545 L'exposition aux rayonnements ionisants à la suite d'un accident d'irradiation (accident dans une centrale nucléaire) ou d'un acte de malveillance peut engendrer des conséquences graves sur la santé des personnes impactées. En effet, l'irradiation d'une large surface du corps, à des doses d'irradiation moyennes à fortes, induit des lésions irréversibles regroupées sous le nom de

syndrome aigu d'irradiation (SAI). Le syndrome hématopoïétique est le premier syndrome radio-induit mis en jeu chez l'homme dans le cas d'une exposition externe partielle ou « corps entier ». Il se traduit par une chute des éléments du sang plus ou moins sévère résultant essentiellement en des risques hémorragiques et infectieux. Il peut engager rapidement le pronostic vital du patient. Les expositions accidentelles aux rayonnements ionisants étant souvent hétérogènes (une partie de la moelle osseuse restant non irradiée), l'existence d'un possible redémarrage de la production sanguine est en faveur d'un traitement par facteur de croissance. Par contre, si le traitement par facteur de croissance reste inefficace, une greffe de cellules doit être envisagée. Par ailleurs, étant donné que la situation de l'accident peut impliquer un nombre important de victimes le problème de l'accès à des stocks importants de cellules souches est un challenge. La preuve de concept a été établie de la possibilité de générer un tissu hématopoïétique fonctionnel (l'ensemble des cellules du sang) à long terme à partir d'un tout nouveau type cellulaire appelé; « hiPSC » (human induced Pluripotent Stem Cells) chez le petit animal. Cette nouvelle technologie permet de produire les cellules à l'origine de la production du sang. Le traitement en urgence de populations nécessite de disposer de produits congelables, permettant de traiter un groupe d'individus. Ainsi des banques de cellules souches obtenues à partir d'hiPSC de grade clinique permettront de produire des cellules souches de différents types pour traiter les victimes. Des hiPSC issues de donneurs « universels » sont déjà disponibles et transposable à une échelle industrielle.

L'objectif de cette étude est de progresser vers la clinique par la reconstitution hématopoïétique lors d'un syndrome hématopoïétique chez le cochon. Il s'agira d'évaluer la reprise d'hématopoïèse humaine xénogénique chez le cochon par une greffe de cellules souches hématopoïétique (CSH) humaine issues en premier lieu de sang placentaire humain afin de démontrer l'efficacité d'un greffon humain chez le cochon sans induire de toxicité aiguë et chronique puis du greffons congelés d'hiPSC différenciées en CSH.

Le modèle de choix de l'évolution de la pré-clinique à la clinique est le cochon de petite taille appelé mini porc.

Ce projet multi sites nécessite 24 cochons et sera effectué en collaboration avec un autre établissement pour les différentes étapes selon les expertises et les équipements de chacun (irradiation, hébergement, connaissance du modèle). Le passage à la clinique nécessite des animaux de grande taille. Il a été montré que la physiopathologie du syndrome hématopoïétique sur le porc de taille réduite (de type miniporc) est similaire à celle observée chez l'homme. De plus, étant donné que la production de cellules hiPS en quantité importante est un paramètre limitant, le choix s'est porté sur le minipig qui est un porc de taille réduite permettant l'injection de cellules en concentration compatible avec leur production. Le nombre d'animaux choisi pour ce protocole est nécessaire et suffisant pour exploiter d'un point de vue statistique les résultats obtenus.

Dans le contexte du bien-être animal, les cages d'hébergement seront enrichies en objets favorisant le bien-être de l'animal. De plus, le raffinement est renforcé par le fait que ces animaux seront anesthésiés pour toutes interventions (irradiation, prélèvements sanguins) et euthanasiés selon la réglementation en vigueur. Des points limites seront définis et appliqués pour mettre fin dans les délais les plus brefs à toute anomalie ou à toute douleur, toute souffrance, toute angoisse ou tout dommage durable constatés qui pourraient être évités tout au long des procédures expérimentales constituant ce projet. L'euthanasie des animaux sera réalisée selon les méthodes approuvées en limitant le plus possible la douleur, la souffrance et l'angoisse des cochons, par une personne compétente de l'établissement hébergeur. Le transport des animaux sera effectué par un véhicule climatisé dédié à ce transport.

15546 Le cancer de la prostate est un cancer dépendant des hormones sexuelles mâles appelées androgènes. Quand les tumeurs ne sont plus confinées à l'organe et donc considérées comme chirurgicalement inopérables, les traitements par suppression androgénique s'imposent. Malheureusement, des résistances à cette castration chimique se développent et favorisent la dissémination des tumeurs aux autres organes (métastases), ce qui représente la principale cause de mortalité du cancer de la prostate. De ce fait, l'identification de voies biologiques contrôlant la

signalisation des androgènes, demeure une nécessité critique pour l'élaboration de stratégies thérapeutiques efficaces contre les tumeurs de la prostate résistantes à la castration.

Dans ce cadre, nous avons récemment identifié un nouveau facteur capable d'interférer sur la signalisation androgénique, en freinant la prolifération des cellules métastatiques cancéreuses de prostate résistantes à la castration. Après avoir analysé son impact sur des cellules en culture, nous avons besoin à ce stade, de connaître son rôle *in vivo*, dans le contexte d'un organisme vivant. Pour cela, nous réaliserons nos expériences dans des modèles de souris transgéniques, issus de croisement de souris surexprimant ou délétées du facteur d'intérêt avec des modèles de souris développant spontanément un cancer de la prostate, et nous observerons le ralentissement ou l'accélération de la progression tumorale prostatique, suite aux altérations des niveaux d'expression de notre facteur d'intérêt. Ces recherches permettront ainsi de définir notre facteur d'intérêt comme cible potentielle d'intervention thérapeutique pour freiner la progression des cancers de la prostate. Nous appliquerons tout au long de ce projet, la règle des 3R

Remplacer : En préambule à nos expérimentations animales, nous avons réalisé des expériences en cellules et réussi à valider l'impact de notre protéine d'intérêt, dans ce contexte *in vitro*. En l'état actuel des connaissances, aucune méthode de substitution ne nous permet de récapituler l'impact de la modulation des niveaux d'expression de notre facteur d'intérêt sur la progression tumorale dans un organisme entier. A ce stade, l'emploi d'un modèle animal comme la souris, récapitulant la physiopathologie des cancers chez les mammifères, est donc essentielle. L'utilisation d'animaux vivants nous permettra non seulement de conforter nos résultats cellulaires dans un système intégré, mais aussi d'entrevoir la possibilité future de transférer nos résultats en clinique et pouvoir à plus long terme, faire bénéficier les patients atteints du cancer de la prostate, des retombées de nos recherches.

Raffiner : Dans un souci de raffinement, nous mettons en place toutes les dispositions permettant de minimiser les souffrances éventuelles qui pourraient être associées à nos expériences. Un suivi quotidien permettra grâce à l'utilisation de grille d'observations cliniques, de détecter précocément une souffrance potentielle des souris à partir de critères objectifs incluant des mesures biologiques et des observations normalisées, et décider du devenir de l'animal au cours de l'expérimentation, notamment par la mise en oeuvre de points limites adaptés. Des schémas de croisement optimisés seront mis en place et des modèles inductibles de souris seront utilisés afin de limiter la souffrance ou stress des animaux, à la seule période précise de l'étude.

Réduire : Nous limiterons la taille des échantillons à ce qui est strictement nécessaire pour garantir une puissance statistique acceptable. Afin de calculer la taille de l'échantillon nécessaire statistiquement, nous avons réalisé un calcul de puissance, test qui permet de minimiser le nombre d'animaux nécessaires pour valider ou non notre hypothèse de départ. Certaines procédures ne seront réalisées que dans le cas où les expériences auront des résultats les justifiant. Le nombre total de souris prévu pour ce projet est de 450.

15547 L'objectif de ce projet est de tester de nouvelles approches thérapeutiques pour la dystrophie myotonique de type 1 (DM1). La DM1 touche 1 personne sur 8000 en France. C'est une maladie dominante caractérisée par une grande variabilité dans la nature et la sévérité des symptômes. Elle se caractérise par une faiblesse musculaire, une myotonie, une cataracte précoce, des troubles cardiorespiratoires, une hypersomnolence, un hyperinsulinisme et des anomalies cognitives et du comportement. La forme la plus grave de la maladie se manifeste dès la naissance par une hypotonie, des problèmes respiratoires sévères, des défauts de succion et de déglutition, et par un retard psychomoteur et un retard mental. Il n'existe à ce jour aucun traitement efficace pour cette maladie.

Afin d'étudier cette maladie au cours du développement et dans différents tissus, nous allons utiliser un modèle de souris transgéniques porteuses du gène muté responsable de la DM1. Ces souris transgéniques reproduisent certaines caractéristiques de la maladie. Nous utiliserons notre modèle afin de tester de nouvelles approches thérapeutiques et de voir si elles améliorent les symptômes

observés chez la souris. Ces études précliniques sont indispensables avant de mettre en place les essais cliniques chez l'homme.

La majorité de nos études consistent à faire des injections chez la souris, et à tester de manière non invasive la fonction musculaire et le comportement. Des études seront aussi réalisées sur des prélèvements effectués après mise à mort de l'animal selon les procédures conformes aux règles d'éthiques en vigueur. D'après nos études antérieures et en prenant en compte la variabilité phénotypique observée dans notre modèle, nous avons pu établir le nombre minimum de souris à utiliser par lot. Plusieurs outils thérapeutiques seront testés selon les mêmes procédures. Ces outils consisteront en plusieurs vecteurs de type AAV permettant d'exprimer des ARN guides et une protéine capables de modifier l'ADN et ainsi, de corriger la mutation qui cause la maladie.

L'utilisation d'animaux est indispensable pour faire des preuves de concepts thérapeutiques, car les modèles cellulaires de la maladie ne permettent pas d'étudier les défauts liés à la fonction du muscle (perte de force non mesurable sur des modèles cellulaires, pas de remplacement possible). A l'opposé, le modèle de souris qui sera utilisé dans ce projet reproduit la pathologie musculaire avec fidélité, ce qui permet de mesurer dans le temps et de façon prédictive de la clinique (c'est-à-dire chez l'homme) l'efficacité des traitements sur l'ensemble des tissus. De plus, la souris que nous allons utiliser comme modèle de la maladie DM1 a l'avantage de porter le gène humain qui cause la maladie et, ainsi, les traitements qui seront testés chez ces animaux seront plus facilement transférables aux patients humains.

Afin de raffiner nos études, les animaux seront hébergés tout au long de l'étude dans des cages enrichies à l'aide de coton et d'abris en carton dans un environnement exempt d'organisme pathogène. En plus, un aliment hydratant et nourrissant sera placé au sol dans la cage afin de faciliter l'accès aux souris malades. Afin de réduire la souffrance et le stress des animaux, des points limites ont été établis et un suivi du bien-être des animaux sera réalisé régulièrement. En cours de protocole, pour prévenir la douleur provoquée par des injections intramusculaires, des anesthésiques seront administrés aux souris. De plus, lors des prélèvements de muscles pour les tests de mesure de force sur muscle isolé, des anesthésiques et analgésiques seront administrés.

Le juste nombre de souris nécessaire pour pouvoir tirer des conclusions a été estimé à 8 souris par groupe par une étude statistique prédictive (test de comparaison des moyennes). Les souris seront élevées et la lignée sera entretenue dans notre établissement utilisateur. Notre projet durera 5 ans et nécessitera l'utilisation totale de 776 souris.

15548 Les ovins sont particulièrement sensibles aux parasites gastro-intestinaux, qu'ils ingèrent en broutant au pâturage. Les conditions de développement des larves de parasites sont soumises à des stress environnementaux. Ces stress peuvent induire des modifications de sensibilité aux anthelminthiques pouvant favoriser la sélection de parasites résistants. Dans le cadre de notre projet, nous souhaitons évaluer l'impact de conditions de culture des larves parasitaires sur l'efficacité des anthelminthiques. Les essais se feront par infestation expérimentale de quatre lots de 6 moutons (2 conditions expérimentales comprenant chacune un lot témoin infesté et non traité, un lot infesté et traité) pour un total de 24 moutons. Chaque expérimentation durera 48 jours.

Réduction : le nombre d'animaux est le minimum recommandé pour réaliser un test d'efficacité.

Raffinement : les animaux sont conduits en lot, et gérés par du personnel qualifié. La dose infestante est limitée pour démontrer des effets tout en minimisant l'impact sur le bien-être des animaux. Le test est mis en place après avoir obtenu de premières observations *in vitro* sur un nématode modèle.

Remplacement : il n'existe pas de méthode de culture des parasites adultes *in vitro*. De plus notre étude vise à reproduire les situations d'élevage.

15549 Le traitement des mammites chez les vaches en lactation s'effectue par l'utilisation d'antibiotiques. Cependant, leur utilisation prolongée développe une résistance antimicrobienne, contamine le lait et les autres productions animales et est à l'origine d'une pollution environnementale liée aux résidus d'antibiotiques. Dans ce contexte, les éleveurs recherchent de nouvelles solutions leur permettant de limiter l'apparition de mammites et l'utilisation des antibiotiques. L'objectif de ce projet

est de tester l'utilisation des huiles essentielles extraites de plantes comme alternative à l'utilisation des antibiotiques en élevage bovin laitier.

Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 24 vaches pour une durée maximale de 3 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction. Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

Remplacement Il n'est pas possible de remplacer l'utilisation d'animaux pour étudier les effets thérapeutiques des huiles essentielles sur les mammites chez la vache

Réduction Nous limitons au maximum le nombre d'animaux par groupe de façon à obtenir des résultats statistiquement fiables. A cause des variabilités inter-animales et intergroupes, un nombre trop restreint d'animaux engendrerait des résultats trop variables et non valides. Compte tenu des données de la littérature (variabilité attendue) et des effets espérés, un test de puissance statistique a été utilisé pour déterminer le nombre minimum d'animaux nécessaire pour cette étude.

Raffinement Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures ont été mises au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal, Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation, les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum. Nous nous efforçons à chaque instant de raffiner nos procédures afin de garantir le bien-être des animaux en cours de procédure grâce à une surveillance attentive des animaux tout le long des expériences.

15550 Le surpoids et l'obésité s'accompagnent d'une inflammation chronique dite de bas grade à l'origine d'un grand nombre de désordres métaboliques et favorisant notamment le développement d'un diabète de type 2. Le tissu adipeux est un véritable organe endocrine qui sécrète de nombreuses molécules inflammatoires. Ces molécules sont à l'origine d'une inflammation localisée pouvant mener au diabète, mais ces facteurs pro-inflammatoires peuvent aussi avoir une action plus systémique. Ainsi, la production et la circulation de ces molécules ont des conséquences néfastes sur le fonctionnement du cerveau. De surcroît, le diabète de type 2 est à l'origine de nombreuses complications au niveau du système nerveux central. En effet, les personnes diabétiques ont une plus grande susceptibilité aux accidents vasculaires cérébraux et les dysfonctionnements centraux en résultant sont généralement plus importants que chez les personnes non-diabétiques. De plus, il semble que les personnes diabétiques et/ou obèses, tout comme les modèles animaux de diabète et de surpoids/obésité, présentent des déficits cognitifs et une susceptibilité aux maladies neurodégénératives plus importants. Enfin, l'inflammation découlant de l'hyperglycémie/obésité perturberaient l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique et pourraient moduler l'activité neurogénique (genèse de nouveaux neurones). Parmi les pistes thérapeutiques innovantes, l'utilisation d'extraits issus de la biodiversité (ex : plantes) représentent des candidats intéressants car leurs usages traditionnels semblent montrer des propriétés anti-inflammatoires, anti-obésité, anti-diabétique d'intérêt ainsi que leur innocuité, d'où l'inscription de certaines plantes à la pharmacopée française. Ces plantes sont inscrites à la pharmacopée et ne semblent donc pas présenter de toxicité. De plus des tests sur larves de poissons montrent l'absence de toxicité aux doses testées.

A travers ces expérimentations menées exclusivement chez le poisson zèbre (adulte : 3 mois à 1 an), nous souhaitons étudier dans un premier temps l'impact d'un régime alimentaire enrichi (en quantité et en cholestérol - artémias +/- jaune d'oeuf -) pendant 4 semaines et induisant un surpoids/obésité sur

- 1) des facteurs métaboliques (glycémie, glycation, lipoprotéines de haute et basse densité - HDL et LDL-cholestérol,)
- 2) l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique (BHE, une barrière protégeant le cerveau)
- 3) la neuro-inflammation
- 4) la neurogenèse

Pour ce faire, nous utiliserons un

- Régime normal 20 x 3 60
- Régime enrichi 20 x 3 60

Total = 120 poissons

Dans un second temps, nous souhaitons étudier l'impact d'extraits issus de la biodiversité sur les facteurs métaboliques perturbés dans le cas du régime et sur le cerveau.

Pour ce faire, nous réaliserons l'expérimentation sur 540 poissons maximum

- Régime enrichi 20 x 3 60
- Régime enrichi + extrait 1 20 x 3 60
- Régime enrichi + extrait 2 20 x 3 60
- Régime enrichi + extrait 3 20 x 3 60
- Régime enrichi + extrait 4 20 x 3 60
- Régime enrichi + extrait 5 20 x 3 60
- Régime enrichi + extrait 6 20 x 3 60
- Régime enrichi + extrait 7 20 x 3 60
- Régime enrichi + extrait 8 20 x 3 60

Tous les animaux utilisés seront des poissons zèbres dont l'âge sera compris entre 3 mois et 1 an.

Cette étude répond aux 3R

Remplacement Il semble indispensable de passer au modèle animal pour mieux comprendre les effets d'un régime riche sur les paramètres physiologiques étudiés.

Réduction les expérimentations ont été conçues afin d'utiliser le moins d'animaux possible, tout en permettant de réaliser des études statistiques (student t-test). Chaque groupe étudié sera subdivisé en 3 expérimentations indépendantes permettant d'arrêter l'expérimentation si les résultats ont assez de force statistique ou si une toxicité inattendue était observée.

Raffinement les poissons seront placés dans des conditions optimales (cycle jour/nuit 14h/10h température 28.5°C oxygénation, nourris plusieurs fois par jours). Ils seront surveillés quotidiennement, et un enrichissement aux artémias sera effectué. Toute manipulation invasive sera suivie d'une anesthésie générale, et tout signe de souffrance sera étudié afin de prendre les mesures adéquates

A noter que le nombre théorique de 660 ne sera très certainement pas atteint.

Ces expériences pourraient permettre de mieux comprendre l'impact de maladies métaboliques (surpoids/obésité) sur le cerveau chez l'Homme et nous amener à développer de nouvelles thérapies préventives voire thérapeutiques chez l'homme, en utilisant des produits issus de la biodiversité.

15551 Le développement et l'utilisation de nanoparticules pour l'imagerie rencontrent un fort engouement. Notre équipe travaille en étroite collaboration avec plusieurs laboratoires de chimie et c'est dans ce cadre que nous sommes amenés à tester les nanoparticules en imagerie chez l'animal. La question principale est de savoir où vont les nanoparticules une fois injectées à l'animal. Dans quels organes vont-elles ? En combien de temps et par quelle voie sont-elles éliminées ? Ces informations sont importantes afin d'envisager l'utilisation de ces nanoparticules chez l'homme pour le diagnostic et/ou le traitement d'une maladie. Avant d'être injectées à l'animal, l'absence de toxicité des nanoparticules sera vérifiée par nos partenaires. La bio distribution des nanoparticules dans l'organisme s'effectuera par imagerie optique qui est une méthode non invasive permettant ainsi de réaliser un suivi dans le temps sur un même animal.

Nous prévoyons de tester une dizaine de nanoparticules par an, à raison de 6 souris par lots, soit 60 souris par an. Sachant que les nanoparticules d'intérêt sont généralement comparées à un contrôle, nous sommes à 120 souris par an. Le projet étant sur 5 ans, soit un total de 600 souris.

Nous utiliserons des souris B6 albinos. Ce sont des souris immunocompétentes au pelage blanc ce qui facilite l'imagerie optique.

REMPACEMENT Une fois injectée dans l'organisme, le devenir des nanoparticules ainsi que leur comportement diffèrent en fonction de leur structure. Ainsi, il est indispensable d'utiliser des animaux pour étudier la bio distribution d'une molécule dans quel organe va-t-elle ? en combien de temps et par quelle voie est-elle éliminée ?

REDUCTION L'utilisation de l'imagerie optique permet de réaliser un suivi dans le temps sur un même animal, ce qui réduit le nombre d'animaux utilisés au final. Seules les nanoparticules ayant un réel intérêt seront testées.

RAFFINEMENT Les lieux d'hébergement et d'expérimentation sont différents. Le transfert des animaux d'un lieu à l'autre se fera dans une cage de transport dédiée munie d'un couvercle filtrant. Le trajet dure quelques minutes. Les souris sont hébergées en groupes sociaux avec un enrichissement du milieu (maison en carton, coton). Toutes les procédures sont réalisées sur animal anesthésié et lors de l'anesthésie les animaux sont placés sur un tapis chauffant pour éviter l'hypothermie. Les animaux sont quotidiennement suivis par l'expérimentateur (pesée, aspect de l'animal) et des soins sont mis en place en cas de mal être.

15552 L'autophagie est un processus cellulaire de dégradation et de recyclage. Il agit comme un système de nettoyage des cellules en piégeant et dégradant des éléments nuisibles pour leur bon fonctionnement. L'activation du processus d'autophagie et une autophagie fonctionnelle sont généralement associées à une bonne santé et une espérance de vie allongée alors que des dérégulations de l'autophagie sont associées au développement de pathologies. Son rôle dans le maintien de la structure et de la fonction de la rétine est largement reconnu. Une diminution de l'activité de l'autophagie est observée au cours du vieillissement physiologique de la rétine et dans la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA), première cause de déficience visuelle dans les pays industrialisés et qui affecterait en France 800 000 à 1 million de personnes. L'autophagie est sensible aux variations nutritionnelles incluant celles en lipides/acides gras.

La rétine est sensible aux variations en lipides alimentaires. Des études ont montré les effets délétères d'un régime alimentaire occidental (taux élevé en acides gras oméga-6 et faible en oméga-3) et les bienfaits apportés par les acides gras polyinsaturés (AGPIs) oméga-3 dans la DMLA.

Nos objectifs sont d'étudier si la proportion relative dans laquelle les acides gras oméga-6 et oméga-3 alimentaires sont consommés et leur nature ont un impact sur le déclin de l'autophagie au cours du vieillissement et l'apparition / la progression de signes du vieillissement dans la rétine. La fonctionnalité de la rétine, l'activité de l'autophagie, des signes de vieillissement et les profils d'acides gras seront analysés au cours du vieillissement dans les rétines de souris exposées à des régimes différant par leur contenu en acides gras oméga-6 et oméga-3 (différents ratio et différents sources alimentaires).

Ce projet a été conçu dans le respect des principes éthiques de la règle des 3R (remplacer, réduire, raffiner). Nous ne pourrions pas remplacer dans le cadre de ce projet l'utilisation d'animaux vivants qui s'avère indispensable pour répondre à notre question expérimentale étudier l'impact d'un facteur nutritionnel sur le vieillissement rétinien. En effet, l'effet des acides gras alimentaires sur la rétine n'est pas direct et met en jeu plusieurs organes/tissus (tractus digestif, le foie, la circulation sanguine, ...) ce qui ne peut pas être modélisé *in vitro*. De plus, il n'existe pas à l'heure actuelle de modèle *in vitro* qui permet de reconstituer la complexité cellulaire et la structure hiérarchisée de la rétine.

Le nombre total de souris nécessaire pour cette étude a été réduit à son minimum (564) pour permettre (i) de tester 4 régimes différents (2 ratios oméga-6/oméga-3 et 2 natures différentes d'oméga-6 et oméga-3 alimentaires) et (ii) l'obtention de résultats interprétables sur les plans scientifique et statistique.

Dans un souci de raffinement, au-delà de ceux nécessaires à ce projet, nous conserverons dans les conditions adéquates tout échantillon biologique qui serait susceptible de répondre à d'autres

questions scientifiques de notre intérêt dans l'objectif de leur valorisation dans le futur. Enfin, nous nous efforcerons de préserver le bien-être animal et d'apporter une réponse adaptée aux contraintes d'inconfort ou de stress (surveillance quotidienne, enrichissement du milieu). Des anesthésiques seront utilisés lors des examens de la rétine (électrorétinographie et imagerie rétinienne), des examens non douloureux mais nécessitant l'absence de mouvement. Des points limites ont été déterminés. Ils seront appliqués tout au long de l'étude.

15553 Notre mode de vie est en décalage avec les rythmes biologiques de notre organisme. Notre alimentation d'aujourd'hui, en plus d'être trop riche en gras et en sucre, ne suit pas ces rythmes circadiens (durée de 24h) qui supposent que l'on mange principalement en début de journée (phase active) et que l'on jeûne sur environ 12h. Ce mauvais alignement des rythmes alimentaires avec notre physiologie a des conséquences délétères sur notre métabolisme énergétique, notre sommeil et aussi sur nos fonctions cognitives. L'équipe coordinatrice a montré chez l'animal juvénile l'effet délétère d'une alimentation obésogène sur la mémoire. Récemment, nous avons obtenu des résultats très prometteurs sur la prévention de ces déficits de mémoire en imposant aux souris un rythme alimentaire aligné sur les cycles jour/nuit (synchronisation forcée).

Les objectifs sont de relier la nature du régime alimentaire chez le juvénile : i) à ses capacités de mémoire, ii) à l'organisation de l'hippocampe et iii) à la régulation de l'activité rythmique de gènes dans le cerveau.

Ce projet est innovant et multidisciplinaire.

La REALISATION du projet concerne 4 groupes expérimentaux réparties en 2 cohortes d'animaux mâles génétiquement modifiés

1- régime d'alimentation obésogène ad libitum (cohorte 1)

2- régime d'alimentation standard contrôle ad libitum (cohorte 1)

3- régime d'alimentation obésogène en synchronisation forcée (cohorte 2)

4- régime d'alimentation standard contrôle en synchronisation forcée (cohorte 2)

Nous nous attendons à ce que la synchronisation forcée rétablisse au moins en partie ce que le régime d'alimentation obésogène ad libitum perturbe, à savoir la dynamique de connectivité des synapses, la performance comportementale ainsi que la régulation de gènes de plasticité dans l'hippocampe durant la consolidation de mémoire.

Pour étudier les mécanismes moléculaires sous-jacents, nous utiliserons deux approches complémentaires pharmacologique et génétique.

L'objectif final est de mieux comprendre et traiter les problèmes de mémoire chez l'enfant obèse.

L'objet de la présente demande, qui concerne en tout 217 souris génétiquement modifiées, consiste en 3 expériences réparties en 16 groupes d'animaux sur lesquels sont pratiqués 2 procédures expérimentales complémentaires. Celles-ci sont l'injection d'agents pharmacologiques et une chirurgie de microscopie dans le cerveau.

Des mesures visant à réduire, remplacer et raffiner les expérimentations ont été mises en place

1) nous utiliserons une souche de souris (c57BL6) pour laquelle l'influence de la chronobiologie est avérée par nos études préliminaires et pour laquelle l'imagerie du cerveau est possible, évitant ainsi d'utiliser plus d'animaux que nécessaire pour la réalisation des objectifs.

2) nous pratiquerons un suivi longitudinal des plusieurs paramètres sur les mêmes souris pour en limiter le nombre tout en gardant la puissance statistique de rigueur.

De plus, nous avons mis en place des points limites et des grilles d'évaluation de la douleur. Afin de réduire les paliers de douleur modérée prévisible des sujets expérimentaux en alimentation obésogène, nous utiliserons un schéma thérapeutique incluant l'utilisation d'anesthésiant local, d'anti-inflammatoire non stéroïdien et de morphinique à faible dose.

15554 Le système glymphatique (SG), récemment découvert, est une voie para vasculaire d'échanges entre le compartiment cérébral et les fluides qui l'entourent. Ce système facilite la clairance des

déchets ou autres substances pharmaceutiques se trouvant dans le cerveau. Étudié initialement dans la maladie d'Alzheimer, le SG est également impliqué et perturbé dans l'AVC. De récentes études de notre équipe ont montré la présence de ce système en imagerie IRM chez le rongeur, ainsi que sa perturbation lors de l'AVC, plus particulièrement lors d'une hémorragie méningée.

L'ensemble des études actuellement disponibles étudient le SG dans le cerveau. Aucune étude n'a cherché à mettre en évidence sa présence dans la moelle épinière (ME), ainsi que son implication dans des pathologies impliquant cette dernière.

Ainsi ce projet a pour but de répondre à deux questions :

- 1) Y a-t-il un SG dans la ME ?
- 2) Si ce dernier est bien présent dans la ME, est-il altéré dans un modèle animal de sclérose en plaques (SEP) ?

Notre projet ne nous permet pas d'utiliser d'autres moyens que de tester notre modèle chez l'animal anesthésié. Les animaux requis seront donc anesthésiés lors des procédures chirurgicales et IRM. Cette étude basée sur l'expérimentation animale prend en compte le bien-être animal et les pratiques éthiques, et répond à la règle des 3 R (remplacer, réduire, raffiner) comme décrit ci-dessous

La souris est l'espèce animale la plus étudiée dans le domaine de la sclérose en plaques. La communauté scientifique dispose pour ces études d'un modèle animal reproduisant en partie les caractéristiques de la SEP l'encéphalite auto-immune expérimentale (EAE) chez la souris.

L'ensemble des connaissances et des acquis dont nous disposons au laboratoire et dans la littérature grâce à ce modèle rend la souris particulièrement intéressante pour étudier la SEP.

Ainsi, les procédures expérimentales décrites dans ce projet ont un caractère de stricte nécessité et ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau d'information. Toutes les procédures seront organisées afin de réduire l'inconfort et le stress liés à la manipulation de l'animal. Toutes les procédures douloureuses seront réalisées sous anesthésie générale associée à une couverture analgésique pour limiter au maximum les sensations de douleur. De plus, l'association d'une étude de puissance statistique basée sur la littérature ainsi que l'utilisation de techniques d'évaluation non invasive comme l'IRM permettront de réduire drastiquement le nombre d'animaux utilisés (n=320). Le bien-être des animaux sera suivi quotidiennement par du personnel formé 7j/7. Les animaux sont hébergés dans des cages standards aux normes européennes suite à la chirurgie. Les principes éthiques et les standards de raffinement sont utilisés jusqu'à la mise à mort de l'animal.

Le nombre total d'animaux à utiliser pour ce projet est de 320 souris.

15555 L'encéphalite à anticorps anti-récepteur N-Méthyl-D-Aspartate (NMDAR) est une maladie auto-immune qui touche le système nerveux central et principalement le cerveau. Il en résulte une inflammation généralisée de ce dernier qui va conduire à différents symptômes bien décrits par les médecins. Si cette maladie est bien diagnostiquée elle reste traitable, néanmoins, la communauté scientifique ne comprend pas encore bien comment elle se met en place ni quel est son mécanisme d'action précis. Ainsi, il arrive fréquemment qu'après un certain laps de temps suite à un premier traitement elle resurgisse impliquant alors l'administration d'un nouveau traitement lourd. L'auto-immunité se met en place quand le système immunitaire n'arrive plus à discriminer ce qui est pathogène (non soi : exemple bactérie ou tumeur) de ce qui est sain (le soi : exemple nos organes, nos cellules). Il va de manière arbitraire venir s'attaquer aux composants de l'organisme (soi) et ainsi mettre en place des pathologies en général invalidantes et chroniques, comme l'encéphalite à anticorps anti NMDAR ou de manière plus connue la sclérose en plaques, un autre exemple de maladie auto-immune touchant le système nerveux central.

Cette maladie a été décrite pour la première fois en 2007. De par sa découverte récente, il y a encore beaucoup de chose qui ne sont pas comprises. De plus, au vu du petit nombre de patients, la communauté médicale n'a pas encore un recul suffisant pour comprendre toute la complexité de

cette pathologie et ses différentes formes. Néanmoins, nous savons qu'elle touche surtout la jeune femme (21 ans environ). Elle a été initialement décrite comme se développant en parallèle d'une tumeur à l'ovaire chez la femme mais qu'il existe également une forme due à un ou plusieurs agents infectieux comme le virus de l'herpès par exemple.

La découverte de cette pathologie a suscité l'intérêt de la communauté médicale et scientifique car elle va surtout avoir un impact sur la mémoire, la cognition et ses symptômes vont être proches, en début de maladie, de ceux observés dans la schizophrénie (hallucinations, troubles de l'humeur et de la personnalité) mais toujours dans le cadre d'une dérégulation du système immunitaire et non d'une atteinte psychiatrique.

Cette maladie est bien caractérisée sur le plan des symptômes. Nous savons qu'elle évolue en 3 phases distinctes. Deux phases pertinentes dans cette pathologie sont la phase psychiatrique et la phase neurologique. Nous proposons de mettre en place un modèle animal ciblé sur l'étude de ces deux phases. La maladie sera mimée par une immunisation active ce qui correspond à une forte vaccination qui va avoir pour conséquence chez la souris de mimer en partie la maladie. Pour la phase psychiatrique, un large éventail de tests comportementaux sera réalisé chez la souris, ce qui nous permettra de valider s'il y a des déficits et leurs similitudes avec la pathologie humaine. De plus, nous pourrons les étudier au fil du temps ce qui sera un plus pour la compréhension de l'évolution de la maladie. La phase neurologique, quant à elle se focalisera plus sur les altérations cellulaires et physiologiques nécessitant l'utilisation de techniques poussées.

Cette étude, basée sur l'expérimentation animale, prend en compte le bien-être animal et les pratiques éthiques, et répond à la règle des 3R (remplacer, réduire, raffiner) comme décrit ci-dessous.

Nous ne pouvons souscrire au principe de remplacement dans ce protocole. En effet, il est nécessaire d'utiliser des animaux dans le cadre de notre protocole. Que ce soit pour les effets de l'immunisation ou bien encore du comportement, il est important de pouvoir tester ces paramètres chez l'animal. De plus, cette étude utilisant des animaux se base sur une bibliographie pertinente rendant cette étude sérieuse et fondée sur des bases déjà établies. Egalement, le système immunitaire est bien connu chez la souris. Il existe notamment d'autres modèles de maladie auto-immunes touchant le système nerveux central sur lesquelles nous allons également nous baser comme l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) mimant une sclérose en plaque. Ce modèle est bien connu et décrit dans la littérature scientifique ce qui en fait un modèle pertinent et sérieux au regard de notre travail. Néanmoins, comme notre modèle est nouveau, il y a des paramètres que nous devons étudier et qui n'ont pas fait l'objet de publication dans le monde scientifique, notamment les effets d'une immunisation contre notre peptide.

Nous utiliserons le nombre minimal d'animaux afin de souscrire au principe de réduction, toutefois, 300 animaux seront nécessaires pour mettre au point ce nouveau modèle en combinant un nombre d'animaux suffisamment pertinents pour mettre en évidence des phénomènes biologiques reproductible et robustes sur lesquels des analyses statistiques pourrons être réalisées en vue de souscrire au principe de réduction du nombre d'animaux.

Afin de souscrire au principe de raffinement, les animaux seront anesthésiés durant chaque procédure. La douleur suite à une injection intraveineuse, intra-cisternale (dans la Cisterna magna), à l'immunisation ou à l'euthanasie sera considérée comme légère à sévère. Toutes les mesures seront prises en amont pour limiter et prévenir en préopératoire et en post-opératoire la douleur des animaux ainsi que leur stress.

15556 L'objectif de ce projet est de tester l'efficacité thérapeutique de composés chimiques ou biologiques dans un modèle reproduisant la pathologie humaine de choc septique.

Le choc septique ou septicémie est un état pathologique critique qui se déclenche suite à une infection généralisée le plus souvent bactérienne. Le choc septique peut intervenir lors d'une appendicite qui évolue en péritonite ou lors de complications suite à une chirurgie (par exemple résection d'un morceau d'intestin lors d'un cancer). Quel que soit l'organe d'origine de l'infection, les symptômes de ce choc correspondent à une très forte chute de pression sanguine accompagnée

de frissons, de fièvre ou d'hypothermie, et de la défaillance en série des différents organes qui peut conduire à la mort du patient (dans 25 à 50% des cas malgré une prise en charge en unité de soins intensifs). Bien que la survie soit le premier critère de mesure de la résolution du choc septique, les patients survivants ne sont pas forcément considérés comme guéris. En effet, ils développent le plus souvent des complications chroniques avec des phases d'inflammation persistantes et d'immunosuppression qui les obligent à être sous surveillance de longue durée à l'hôpital.

Pour mimer la séquence d'évènements induits par une péritonite, l'induction du choc septique chez la souris peut être réalisée de 2 manières différentes soit par injection intrapéritonéale d'une suspension de fèces ou de lipopolysaccharide (protéine immunogène des bactéries gram négatif), soit par ligature et perforation du cæcum (CLP) via une chirurgie pratiquée sous anesthésie générale assortie d'une analgésie pré et post opératoire.

Le recours à ces modèles animaux se justifie par l'absence de tests *in vitro* ou *ex vivo* permettant de récapituler la symptomatologie de cette pathologie à un stade précoce (choc septique) ou tardif (phases chroniques post choc septique).

Les signes cliniques quasiment immédiatement attendus dans ces modèles sont une pilo-érection et une fièvre puis après quelques heures une prostration assortie d'une hypothermie dont l'ampleur sera prise en compte pour les points limites de ce projet. Une température corporelle inférieure à 32°C sera considérée comme un point limite nécessitant l'euthanasie de l'animal.

Le choc septique ayant un développement rapide, l'observation des animaux sera réalisée plusieurs fois par jour (toutes les 4 heures durant la phase aigüe et plus de 3 fois par jour ensuite) afin de suivre le développement des signes cliniques et de décider de l'euthanasie de l'animal si son pronostic vital est engagé.

Les composés chimiques ou biologiques à évaluer seront administrés par une voie adaptée à celles utilisées lors de la réanimation de patient dans cette pathologie (intraveineuse, sous-cutanée voire intrapéritonéale) en fonction de leurs paramètres pharmacocinétiques, et le choix du modèle sera dicté en fonction du mécanisme d'action des composés à tester.

Une analyse bio-statistique des données générées dans ces modèles sera réalisée, afin d'inclure le minimum d'animaux requis par groupe pour obtenir un résultat significatif sur la phase aigüe de la maladie et/ou une normalisation de la réaction inflammatoire (phase tardive de la maladie).

Ce projet nécessitera une utilisation moyenne de 200 souris par an, donc 1000 animaux au maximum pour la durée totale du projet sur 5 ans.

15557 Lors du développement du système nerveux, les neurones s'organisent en réseaux permettant notre fonctionnement moteur, sensoriel et cognitif. Ces réseaux ne sont cependant pas figés et cette « plasticité » permet à notre cerveau de s'adapter à l'environnement. La découverte de la génération de nouveaux neurones chez l'adulte (processus appelé neurogénèse adulte) a provoqué de nombreux débats. Il est désormais démontré que ce processus participe à la plasticité neuronale. La neurogénèse adulte joue notamment un rôle dans la régulation de nombreux processus cognitifs comme la mémoire ou dans certains désordres psychiatriques tels que la dépression et le stress post-traumatique. Chez l'être humain, une région de l'hippocampe est un des lieux privilégiés de la neurogénèse adulte. L'hippocampe contient des cellules qui peuvent soit se diviser pour maintenir leur population, soit, en fonction de signaux spécifiques, se différencier en neurones. Le neurone « nouveau-né » sera intégré dans les réseaux hippocampiques et participera à la régulation de l'activité neuronale de cette structure.

Un dysfonctionnement des réseaux neuronaux suite à une dérégulation est à l'origine de nombreuses maladies neurodégénératives. Parmi celles-ci, la maladie d'Alzheimer (AD) est la première cause de démence dans le monde. Cette maladie est caractérisée par l'apparition de l'accumulation de filaments. Si l'étiologie de cette pathologie reste peu claire, les processus inflammatoires semblent exacerber, voire provoquer, les dérégulations des neurones touchés dans cette maladie.

La protéine CAR (coxsackievirus and adénovirus récepteur) fait partie d'une famille de protéines qui renforcent l'interaction cellule-cellule. CAR est présent dans les neurones « nouveau-né » dans

l'hippocampe. Nous avons constaté que l'absence de CAR entraîne des modifications de comportement.

Nous savons aussi que l'inflammation peut influencer l'équilibre entre la genèse et la dégénérescence des neurones. Nous avons montré que dans les cerveaux sains ou à risque de maladie stimulé par des infections, l'expression de CAR est diminuée dans les neurones nouveaux. De plus, aux premiers stades d'apparition de la maladie d'Alzheimer, les taux de CAR sont considérablement réduits dans l'hippocampe. Nos études nous ont amenés à proposer que la perte de CAR contribue aux défauts cognitifs.

Ici, nous explorerons plus en détails la fonction de CAR pendant la neurogenèse adulte. Pour atteindre nos objectifs, nous utiliserons un système qui nous permettra de contrôler l'expression de CAR à des moments spécifiques. En utilisant cette approche, nous pourrions mesurer l'impact de la réduction de CAR afin de mieux comprendre son rôle dans le cerveau adulte.

Nous prévenons utiliser 290 souris, la moitié d'entre eux sont des mâles, l'autre moitié des femelles. Pour le volet « réduction », nous avons fait une analyse bibliographique poussée afin de définir les expériences à réaliser et nous avons mené une longue réflexion avec notre statisticien pour définir au mieux le nombre d'animaux nécessaire à la réalisation de ce projet et réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Notre étude est basée sur l'évolution du nombre de nouvelles cellules créées dans l'hippocampe. Nous savons que cette région du cerveau est touchée par la maladie d'Alzheimer et que cette maladie (comme bien d'autres) affecte différemment les femmes et les hommes. Pour cette raison, nous voulons utiliser des femelles et des mâles dans notre étude parce que dans la majorité des études, seuls les mâles ont été utilisés et créant un biais important concernant la façon dont les femelles sont affectées. Pour le volet « raffinement », nous portons une attention toute particulière au bien-être des animaux. Nous avons une cellule du « bien-être animal » (SBEA Structure chargé du Bien-Être Animal) qui vérifie quotidiennement le bien-être des animaux et nous avons augmenté l'enrichissement du milieu avec des copeaux et des maisonnettes. Les protocoles sont soumis au comité d'éthique interne à notre institut et comportent notamment les points limites pour chaque expérimentation. Les procédures sont réalisées par du personnel qualifié et habilité dans le cadre de la réglementation définie par les dispositions européennes et nationales.

15558 Autrefois considérée comme nuisible, la lamproie marine *Petromyzon marinus* subit depuis quelques années une chute drastique de ses effectifs de géniteurs dans l'ensemble des bassins versants français. La chute est impressionnante sur le bassin versant avec historiquement les plus fortes populations de lamproies, où les effectifs dénombrés aux stations de comptage sont passés de 55 000 en 2015 à 20 en 2019. Compte tenu de ces signaux d'alerte forts, l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature (IUCN) a classé la lamproie marine au niveau « EN – endangered » dans sa liste rouge pour la France.

Plusieurs causes à ce déclin ont été identifiées, mais leurs importances relatives varient fortement selon la zone géographique

1 – les prélèvements par la pêche professionnelle

2 – la dégradation (physique et chimique) des habitats, notamment des frayères

3 – la perte de la continuité écologique, rendant inaccessible des portions considérables des bassins versants à cette espèce aux capacités de nage limitées.

Pour répondre à ces questions et proposer in fine les mesures de gestion les plus appropriées, et donc les plus efficaces, un consortium composé d'un laboratoire de recherche, d'un bureau d'étude et de deux associations professionnelles de pêcheurs va lancer en 2020 une étude de 24 mois sur la migration de reproduction des lamproies marines *Petromyzon marinus*.

Cette étude se décompose en deux volets distincts

Le volet 1 a pour but de répondre à la question sur les prélèvements par la pêche professionnelle via une méthode de Capture-Marquage-Recapture (CMR).

Pour cela, 1600 individus (800 en 2020, 800 en 2021) seront marqués avec des marques passives (Passive Integrated Transmitters Tags, aussi appelé Pit-tags) et relâchés dans le fleuve. L'implantation de la marque de type Pit-tag (de 32 mm de long, 3.7 mm de diamètre et 0.8 g dans l'air) se fera à l'aide d'un injecteur de type seringue sous anesthésie générale (benzocaïne, 150 mg/l). Durant toute la période de montaison des lamproies marines, toutes les lamproies pêchées par les pêcheurs professionnels passeront à travers une antenne de détection qui permettra de vérifier ou non la présence d'une marque passive. Cette opération est possible grâce au soutien et à la participation active de l'ensemble des acteurs de la chaîne, des pêcheurs jusqu'au mareyeurs. Après récupération, les individus seront remis à l'eau très rapidement.

Le volet 2 a pour but de répondre à la question de la localisation des frayères et à l'identification des facteurs de blocage de la migration de montaison.

Pour cela, un suivi en télémétrie acoustique de 100 individus sera effectué pour identifier précisément les localisations des frayères et l'impact des ouvrages. Ces 100 individus seront sélectionnés parmi ceux utilisés pour le volet 1. Ce suivi nécessite l'implantation chirurgicale d'un émetteur acoustique dans les individus à suivre. L'implantation de la marque de type acoustique (13 mm de diamètre et 13.8 g dans l'air) se fera avec une incision chirurgicale sous anesthésie générale (benzocaïne, 150 mg/l). Après récupération, les individus seront remis à l'eau très rapidement.

Cette étude en écologie de la conservation nécessite l'étude d'individus sauvages car des individus d'élevage pourrait avoir un comportement modifié. De plus, la reproduction des lamproies en milieu contrôlés n'est pas maîtrisée actuellement. Les particularités biologiques de cette espèce (espèce migratrice, faible capacité de locomotion, mode d'alimentation hématophage) la rendent complètement unique, et aucune autre espèce de poissons ne peut être utilisée en remplacement.

En tout, 1600 individus seront marqués, soit avec une marque passive uniquement, soit avec une marque passive et une marque acoustique. Ce nombre peut paraître élevé, mais il est de plus en plus difficile de publier des études avec des effectifs réduits. De plus, tous les individus marqués seront rachetés à la pêche professionnelle, et étaient donc destinés à la consommation humaine. Dans le cadre de cette étude, ils pourront donc finalement se reproduire et participer au stock. Le nombre ne devrait donc pas être considéré comme un facteur limitant.

L'implantation des marques (passives et acoustiques) se fait sous anesthésie générale, par du personnel qualifié et surtout très expérimenté, qui marque des centaines d'individus chaque année. Pour l'implantation chirurgicale, sur les expérimentations précédentes, et sur des modèles biologiques proches, les mortalités post-opératoires ont toujours été nulles. De plus, lors des expérimentations précédentes, les marqueurs chimiques de stress (lactate) qui sont mesurés au moment de l'opération ont toujours montré des taux très bas, suggérant que l'opération de marquage entraîne peu de stress et de douleur. La télémétrie acoustique est la méthode la plus pertinente pour répondre à nos questions. En effet, d'autres méthodes de marquage individuel non-invasives existent mais elles n'offrent pas la précision de la télémétrie acoustique qui permet de suivre très précisément les déplacements d'un individu.

Cette expérimentation apportera donc des éléments indispensables pour la gestion, donc la conservation, et donc in fine la survie de cette espèce sans sacrifier d'animaux, car tous les animaux utilisés auraient été consommés sans cette étude. Avec cette étude, ils seront remis à l'eau et pourront participer à la reproduction et donc au maintien du stock.

15559 Dans le contexte de la réduction de l'utilisation d'antibiotiques en médecine vétérinaire et afin de limiter l'émergence de la résistance bactérienne, le développement de stratégies destinées à réduire la consommation antibiotique est fortement encouragé. Le composé C est une molécule chimique, d'origine naturelle, n'étant dotée d'aucune activité antibiotique propre mais présentant des effets synergiques intéressants *in vitro* lorsqu'elle est associée à certains antibiotiques, tels que l'amoxicilline. Ainsi, l'association amoxicilline + composé C est plus active que l'amoxicilline seule sur un large panel de souches de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) d'origine vétérinaire testées *in vitro*.

L'objectif de la présente étude est d'évaluer l'effet synergique du composé C chez la souris dans deux modèles d'infection musculaire (cuisse) et systémique (sepsis) à *S. aureus*, seul ou en association avec l'amoxicilline. Les doses testées seront différentes des 2 précédentes études déjà menées sur le sujet. Cette étude permettra de conclure sur l'existence ou non d'une synergie entre ces deux traitements, et ainsi d'envisager de réduire les doses d'antibiotique utilisées.

Dans le cadre de cette étude, une attention particulière sera portée au respect de la règle des 3R. Le nombre d'animaux nécessaire pour répondre aux hypothèses et permettre une analyse statistique robuste a été réduit à 5 par groupe (au lieu de 10) grâce à l'expérience acquise lors d'études précédentes. Des analyses *in vitro* ont déjà été réalisées sur l'efficacité du composé C. Toutefois l'efficacité de tels composés ne peut être confirmée que dans des modèles pré-cliniques (notamment pour des aspects de diffusion tissulaire), c'est pourquoi aucune stratégie de remplacement ne peut être envisagée. Enfin, un enrichissement du milieu (jouets en plastique, igloos en carton) sera utilisé et une surveillance accrue sera également réalisée pour cette étude (raffinement). L'infection musculaire sera réalisée par du personnel expérimenté et représente une douleur de classe légère (la classe légère ne nécessite pas d'anesthésie). De plus compte tenu de la durée de l'expérience (9h) aucun antalgique ne sera administré et aucun signe de septicémie n'est attendu.

95 souris CD1 sont nécessaires pour la mise en œuvre de ce projet.

15560 Les cellules Th17 sont des globules blancs qui peuvent avoir des activités très différentes en fonction du contexte dans lequel elles évoluent. En effet, elles peuvent soit avoir une activité inflammatoire qui va exacerber les réponses immunitaires soit une activité immunorégulatrice qui, à l'inverse, va bloquer la réponse immunitaire.

Nos travaux, réalisés *in vitro*, montrent que les cellules Th17 immunorégulatrices deviennent inflammatoires lorsque la protéine NLRP3 n'est plus présente. Ceci peut avoir des intérêts thérapeutiques majeurs. En cancérologie, il est intéressant de produire principalement des cellules Th17 inflammatoire (car elles sont antitumorales) alors que dans les pathologies inflammatoires telles que la sclérose en plaque, il est préférable de bloquer ces Th17 inflammatoires au profit des Th17 immunorégulateurs.

Au cours d'une précédente étude, nous avons analysé si les cellules Th17 ayant perdu NLRP3 possédaient bien une activité inflammatoire et anti tumorale. Dans le but d'élargir le champ d'application de nos observations nous souhaitons aujourd'hui montrer le rôle de NLRP3 dans la balance Th17 inflammatoire/immunorégulateur dans un modèle murin de sclérose en plaque (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis – EAE).

Pour cela nous allons utiliser deux modèles d'induction d'EAE chez la souris. Dans les 2 modèles, la gravité de la maladie sera évaluée quotidiennement par des scores cliniques.

Dans le premier modèle d'EAE, des injections sous-cutanées d'une combinaison de molécules déclenchent artificiellement une sclérose en plaque. Afin de répondre à notre question, l'EAE sera induite dans 40 souris C57Bl6 transgéniques (CD4^{cre} x NLRP3^{flox}) et leur contrôle, nous permettant d'apprécier spécifiquement le rôle de NLRP3 dans les Th17 durant la maladie.

Dans le second modèle d'EAE, un premier lot de souris, 20 C57Bl6 transgéniques (CD4^{cre} x NLRP3^{flox}) et 20 contrôles, permettra de générer des cellules immunitaires Th17 dirigées contre la myéline. Ces cellules seront ensuite injectées en intra péritonéale à 40 souris C57Bl6 afin de déterminer si elles sont capables ou non d'induire l'EAE.

Pour les deux expériences, les souris seront mises à mort et les organes d'intérêt (système nerveux central, ganglions et rate) seront étudiés pour caractériser les globules blancs infiltrant.

La mise en place de ce projet s'est attachée à respecter la règle des 3R. Tout d'abord, les expériences ne seront réalisées que deux fois et les rates, les ganglions et les prélèvements d'organes seront analysés sur les mêmes animaux ce qui permet donc de réduire le nombre d'animaux de l'étude. Nous avons fait appel à un méthodologiste afin de déterminer au mieux le nombre minimal de souris requis pour que nos tests statistiques soient suffisamment puissants. L'utilisation des souris de manière indépendante nous permettant d'avoir une réelle puissance

statistique. Des expériences ont été réalisées *in vitro* (remplacement) au préalable pour déterminer l'impact de l'absence de NLRP3. Enfin, les souris seront observées quotidiennement pour limiter au maximum leur inconfort, raffinement de l'étude. Les animaux seront hébergés à raison de 10 souris par cage en présence des éléments nécessaires à la fabrication d'un nid. De la nourriture et un apport hydrique pourront être ajoutés dans les cages si besoin. Les douleurs induites par les injections sous-cutanées et intrapéritonéales sont légères et ne nécessitent pas que les animaux soient anesthésiés. Aucune autre douleur n'est attendue. Cette étude nécessitera 120 souris.

15561 La sclérose en plaques (SEP) est une maladie auto-immune du système nerveux central. Le système immunitaire des patients va venir attaquer les gaines de myéline entourant les axones (phénomène appelé démyélinisation). Une composante neurodégénérative, en lien avec la démyélinisation, contribue également à la mise en place des symptômes. Il existe plusieurs formes de SEP dans la majorité des cas, le déroulement de la maladie se distingue par la succession de périodes de poussées et de rémissions, de durée et de fréquence variables, correspondant à des cycles d'apparitions de symptômes et de récupérations totales ou partielles. D'un point de vue physiopathologique, les cycles de poussées et rémissions correspondent à des phases de démyélinisation et de remyélinisation, associées à des statuts neuroinflammatoires différents. Des dommages axonaux, constituant la composante neurodégénérative apparaissent au cours de la maladie, et peuvent conduire à des dommages irréversibles. Deux millions de personnes sont touchées par cette maladie dans le monde, dont 100.000 en France. L'apparition de la SEP se situe typiquement entre 20 et 40 ans. Elle constitue pour cette raison la première cause d'handicap moteur du jeune adulte. Des études rapportent que les stress aigus de la vie (divorce, difficultés au travail, déménagement, décès d'un proche, etc.) augmentent chez les patients atteints de SEP la probabilité de faire une poussée. Ces poussées sont souvent accompagnées de troubles intestinaux chez les patients. De récentes études montrent qu'un stress aigu chez la souris augmente la perméabilité intestinale. L'hypothèse est qu'une altération de la perméabilité intestinale pourrait avoir lieu pendant les poussées de SEP. De plus, un stress aigu pourrait augmenter cette altération intestinale, provoquant ainsi une aggravation de la maladie.

L'objectif du présent projet est, à l'aide de souches probiotiques, d'empêcher les modifications de perméabilité intestinales induites par le stress aigu et par la maladie (EAE) afin de diminuer les déficits des souris atteintes d'un modèle de SEP.

Cette étude basée sur l'expérimentation animale prend en compte le bien-être animal et les pratiques éthiques, et répond à la règle des 3 R (remplacer, réduire, raffiner) comme décrit ci-dessous. La souris est l'espèce animale la plus étudiée dans le domaine de la sclérose en plaques. La communauté scientifique dispose pour ces études d'un modèle animal reproduisant en partie les caractéristiques de la SEP l'encéphalite auto-immune expérimentale (EAE) chez la souris. L'ensemble des connaissances et des acquis dont nous disposons au laboratoire et dans la littérature grâce à ce modèle rend la souris particulièrement intéressante pour étudier la SEP. Ainsi, les procédures expérimentales décrites dans ce projet ont un caractère de stricte nécessité et ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau d'information. Toutes les procédures seront organisées afin de réduire l'inconfort et le stress liés à la manipulation de l'animal. Toutes les procédures douloureuses seront réalisées sous anesthésie générale associée à une couverture analgésique pour limiter au maximum les sensations de douleur. Le bien-être des animaux sera suivi quotidiennement par du personnel qualifié et formé 7j/7. Plusieurs fois par jour, un contrôle du bien-être animal est réalisé sur l'ensemble des animaux utilisés dans ce projet. Les animaux sont hébergés dans des cages standards aux normes européennes. Les principes éthiques et les standards de raffinement sont utilisés jusqu'à la mise à mort de l'animal.

Ainsi, le nombre de 280 souris prévues dans le projet est le strict minimum nécessaire afin de bénéficier d'une puissance statistique suffisante, tout en réduisant au maximum le nombre d'animaux.

15562 Le vieillissement de la population et les maladies cardiovasculaires génèrent des pathologies parmi lesquelles l'insuffisance rénale, qui au stade sévère, occasionne des traitements lourds tels que la dialyse et la transplantation. La dysfonction rénale se traduit généralement par une diminution de la fonction de filtration du rein. Environ 10 % de la population générale, dont deux tiers d'hommes, présenterait une insuffisance rénale. Il est donc essentiel de pouvoir diagnostiquer efficacement cette maladie afin de prendre en charge au plus vite les patients, et ainsi, empêcher sa progression vers un stade sévère tel qu'une insuffisance rénale chronique. Les marqueurs biologiques utilisés actuellement pour évaluer l'avancée de la maladie sont des mesures indirectes de protéines données (comme la créatinine) dans le sang, mais ces mesures sont insuffisantes car imprécises et non spécifiques. Il est donc nécessaire de disposer de nouvelles méthodes de diagnostic quantitatives plus fiables de la dysfonction rénale.

Le but de ce projet, établi sur 5 ans, est d'évaluer de nouvelles molécules d'imagerie, appelées sondes, pour le diagnostic de la dysfonction rénale sur un modèle murin. Un modèle de fibrose rénale chez la souris reflétant cette pathologie, permettra d'évaluer la capacité de nos sondes à diagnostiquer la pathologie. Ce modèle sera mis en place dans une entreprise spécialisée puis envoyé dans notre structure. Ce modèle est induit par une succession d'injection intrapéritonéale d'un acide qui va altérer les reins et leur fonction de filtration du sang, ce qui permet l'établissement d'une insuffisance rénale rapide et réversible en cas d'arrêt prolongé du traitement. Les résultats obtenus seront comparés à ceux observés chez des souris saines pour évaluer l'accumulation de la sonde d'imagerie dans la pathologie ainsi qu'aux résultats obtenus avec un autre agent de contraste. Les modèles de fibrose ou dysfonction rénale ne possèdent pas d'équivalent en modèle *in vitro*. L'utilisation du modèle animal reste indispensable pour atteindre l'objectif du projet.

Les animaux sains et ceux présentant l'insuffisance rénale seront anesthésiés pour l'injection de l'agent radiomarqué via la veine jugulaire gauche et seront maintenus sous anesthésie au cours de l'imagerie pour limiter leur stress et leur mouvement. La procédure optimale pour évaluer la distribution au sein de l'organisme de l'agent de contraste par imagerie est maintenant bien décrite et maîtrisée. Il est désormais nécessaire d'évaluer les conséquences claires de la pathologie sur la distribution du produit dans l'ensemble de l'organisme et ainsi utiliser l'imagerie comme propre outil de diagnostic grâce à une procédure d'imagerie optimale et un modèle animal maîtrisé. En fin de procédure les animaux seront euthanasiés et les reins seront prélevés afin de corréler les résultats obtenus par imagerie avec les méthodes d'analyses de référence telles que l'autoradiographie, l'histologie et le comptage tissulaire.

Pour ce projet, la règle des 3R sera respectée. A l'heure actuelle, il n'existe pas d'équivalent *in vitro* d'insuffisance rénale, l'utilisation d'animaux reste donc indispensable pour ce type de projet. Le nombre d'animaux a été limité au minimum, à savoir 90, pour obtenir des résultats avec des tests biostatistiques utilisés. Des points-limites ont été établis et une grille d'évaluation de la douleur a été développée spécifiquement pour cette étude. Un score de douleur trop élevé, même après médication, impliquera la mise à mort de l'animal avant la fin de l'étude. Des antidouleurs seront utilisés en cas de nécessité suite à l'établissement du modèle d'insuffisance rénale ainsi qu'en préventif lors de la pose du cathéter veineux.

A terme, les résultats de ce projet permettront de développer une méthode de diagnostic basée sur l'imagerie ainsi qu'un traitement personnalisé contre les dysfonctions rénales, avec une perspective de transfert chez l'Homme.

Cette demande ne concerne que la partie biodistribution par imagerie, le modèle animal étant généré sur un autre site.

15563 La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA ou maladie de Charcot) est une pathologie neurodégénérative caractérisée par une perte sélective et progressive des neurones moteurs. L'atteinte de ces neurones entraîne une faiblesse musculaire évoluant vers une tétraplégie. Le patient meurt de déficience respiratoire 3 à 5 ans après le diagnostic. Aucun traitement curatif n'existe à ce jour et seul le Riluzole augmente l'espérance de vie des patients d'environ 90 jours. Ouvrir de nouvelles pistes thérapeutiques se révèle donc être un enjeu majeur dans le traitement de la SLA. Bien que l'étiologie de cette maladie reste mal connue, parmi les phénomènes

physiopathologiques observés chez les patients et dans les modèles animaux, les altérations mitochondriales demeurent constantes et pourraient jouer un rôle important dans la mort sélective des neurones moteurs. Rétablir les fonctions mitochondriales pourrait donc être une piste thérapeutique d'intérêt.

La considération de ces déficits nous a conduit à développer une stratégie thérapeutique visant à restaurer le bon fonctionnement des mitochondries. Pour cela une protéine virale, connu pour ses propriétés neuroprotectrices dans un autre modèle de maladie neurodégénérative, a été isolé et introduit dans des modèles de souris transgéniques de SLA. Dans cette étude, l'administration de cette protéine ou de son peptide dérivé retardait l'apparition des déficits moteurs chez les souris malades. Toutefois, le mode d'administration utilisé nous apparaît non optimal et une amélioration de l'administration de cette protéine dans les neurones moteurs et jusqu'à la mitochondrie semble être déterminant dans les effets neuroprotecteurs induits. Le présent projet vise à accroître le potentiel neuroprotecteur de cette protéine d'intérêt en optimisant son mode d'administration et en favorisant son adressage à la mitochondrie. Pour cela, la protéine d'intérêt sera administrée dans les neurones moteurs à l'aide d'une technique de thérapie génique. Les souris traitées seront suivies par différentes techniques expérimentales rendant compte de l'évolution de la maladie (test moteur, enregistrements musculaires, marquage des neurones moteurs et des jonctions neuromusculaires). Nous pensons que la réalisation de ce projet sera d'un intérêt majeur car il pourrait permettre d'accroître le potentiel thérapeutique de cette protéine virale non seulement en retardant l'apparition et la progression des troubles moteurs mais également en prolongeant la survie des animaux. Ces résultats pourraient alors ouvrir de nouvelles voies thérapeutiques pour une application chez l'homme.

En conformité avec la règle des 3 R, le recours à l'animal entier se justifie car il est déterminant dans les études précliniques, seule une approche intégrée peut rendre compte de l'efficacité de cette protéine virale sur le retard de l'apparition et de la progression de la maladie ou encore sur la prolongation de la survie des animaux. Le nombre d'animaux sera réduit à un nombre minimum par groupe expérimental pour une interprétation statistique correcte des résultats. Ainsi chaque condition expérimentale testée concernera un lot de 12 animaux. Au total 888 animaux seront utilisés sur une période de 5 ans. Afin de limiter le nombre d'animaux, des études préliminaires sur des effectifs réduits seront réalisées quant aux modalités d'injection de la protéine X (injection intraveineuse versus injection intracérébrale). Des expérimentations d'histologie de différents tissus seront également réalisés sur les mêmes animaux en vue de réduire au maximum le nombre de souris utilisé pour ce projet. Des mesures de raffinement seront mises en place durant toute la durée du projet. Les animaux seront hébergés au sein d'un établissement utilisateur agréé dans des conditions d'hébergement favorisant leur bien-être (enrichissement, suivi quotidien par du personnel qualifié). L'ensemble des procédures sera réalisé suivant les gestes éthiques avec les technologies les moins invasives possibles.

15564 L'utilisation du pâturage mixte en élevage, qui consiste à conduire différentes espèces d'herbivores sur une même surface à l'échelle d'une saison de pâturage, vise généralement à mieux valoriser la ressource végétale en tirant profit des différences de choix alimentaires des espèces. Chez les ruminants, plusieurs travaux ont montré l'intérêt du pâturage mixte pour limiter les zones refusées par les animaux au sein des parcelles et pour accroître la valeur alimentaire du couvert végétal. Le pâturage mixte peut également constituer une stratégie pour réduire l'infestation des herbivores par les strongles gastro-intestinaux, la majorité des espèces de strongles étant spécifique d'un hôte. En conséquence, les performances zootechniques individuelles et à l'hectare peuvent être améliorées tout en limitant le recours aux intrants en élevage.

En dépit de l'augmentation du nombre de chevaux de sang en France et en Europe liée à l'engouement pour les activités de sport et loisir équestres, et de leur association commune avec les bovins (en particulier allaitants) au sein de systèmes d'élevage, les connaissances sur le pâturage mixte équin-bovin sont limitées. Les références disponibles portent majoritairement sur l'impact de leur prélèvement sur la végétation dans le cadre de la conservation de milieux « sensibles », pour lesquels il existe de forts enjeux vis à vis de la préservation de la biodiversité et/ou

de la limitation de l'embroussaillage (ex : zones humides, landes). Les références relatives aux prairies mésophiles plus productives qui constituent le principal support de production des chevaux de sang et des bovins dans les bassins herbagers font défaut.

Notre projet vise à évaluer les bénéfices supposés du pâturage mixte entre chevaux de sang et bovins allaitants comparativement à une conduite séparée des espèces au sein de prairies permanentes fertiles. Le dispositif expérimental, prévu initialement sur deux années consécutives, implique trois parcelles pâturées à même charge animale (exprimée en UGB/ha=unité de gros bétail par hectare permettant de comparer différentes espèces animales) soit (i) par 3 poulains de sang de 2 ans et 6 génisses charolaises d'1an, (ii) par 6 poulains de sang, (iii) par 12 génisses charolaises. Des mesures du comportement alimentaire des animaux, de leur niveau d'infestation parasitaire et de leur croissance sont effectuées. Nous analysons également l'impact des trois modalités de pâturage sur la structure et la valeur alimentaire du couvert prairial.

Nous demandons par le présent avenant une prolongation de ce projet pour une année supplémentaire. En effet, l'objectif est d'accroître le nombre de données relatives à l'impact des différents traitements sur la structure et la valeur alimentaire du couvert végétal dans un contexte où il n'a pas été possible de réaliser une répétition intra-annuelle pour chacun des traitements d'une part et où les conditions météorologiques ont été très contrastées entre les deux premières années du projet d'autre part. De ce fait, ce projet impliquera au total 83 animaux (3 x 27 animaux, plus 2 génisses intégrées en cours d'expérimentation).

Application de la règle de Remplacement-Réduction-Raffinement.

Seuls des tests utilisant les animaux peuvent permettre d'évaluer et de comprendre l'intérêt du pâturage mixte équin-bovin vis à vis des performances animales et des caractéristiques du couvert végétal. L'association entre des jeunes animaux de chaque espèce telle que nous l'envisageons dans ce projet est classiquement observée dans les élevages mixtes. Elle permet d'évaluer l'intérêt de la mixité vis à vis de la réduction du parasitisme sur une classe d'âge particulièrement sensible et d'obtenir des références sur la croissance des animaux. Les effectifs utilisés (9 poulains et 18 génisses chacune des deux années du projet) sont nécessaires pour respecter les besoins sociaux des deux espèces dans chacune des parcelles et pour ne pas biaiser l'exploration de l'espace par les animaux. Ils sont conformes avec les travaux publiés relatifs à l'impact de différents modes de conduite des herbivores domestiques au pâturage. La répétition du dispositif sur deux années est nécessaire pour obtenir un nombre de données suffisant et pour apprécier les effets des trois traitements sur la structure et la valeur alimentaire du couvert prairial. Les stratégies de raffinement utilisées sont (i) au plan de la conduite des animaux maintenus en lots avec plusieurs individus de la même espèce, l'utilisation d'animaux du même âge au sein de chaque espèce, des animaux habitués aux intervenants avant les manipulations, une conduite au pâturage avec une charge animale adaptée et avec un apport de fourrages en cas de sécheresse, (ii) des interventions de personnels habitués et formés aux manipulations, (iii) un suivi quotidien du comportement et de l'état des animaux, un suivi mensuel de leur croissance et bimestriel de leur charge parasitaire.

15565 Les douleurs chroniques sont très fréquentes et les traitements disponibles souvent peu efficaces. Une des raisons à cet échec est qu'il n'y a pas une mais des douleurs chroniques. En effet, les douleurs chroniques se manifestent par plusieurs symptômes douleurs spontanées, et douleurs provoquées par une stimulation normalement non douloureuse (allodynie) ou douloureuse (hyperalgésie). Chaque symptôme dépendant de mécanismes distincts, un médicament efficace sur l'un ne le sera donc pas nécessairement sur un autre d'où la nécessité de traitements spécifiques pour chacun d'eux.

Nous nous intéressons aux mécanismes de l'allodynie mécanique, un des symptômes les plus fréquents observés chez les patients douloureux chroniques. Comment le toucher devient-il douleur ? Normalement, ces sensations sont indépendantes. Les nerfs véhiculant les messages douloureux se terminent dans les couches superficielles de la moelle épinière et ceux véhiculant les messages tactiles dans les couches profondes. Cependant, suite à une lésion nerveuse ou une inflammation périphérique, les informations tactiles peuvent accéder aux neurones de la douleur des couches superficielles via un 'court-circuit' et provoquer ainsi une allodynie mécanique. Un petit nombre de

neurons appartenant à ce circuit a été identifié, mais le manque d'informations concernant le réseau dans son ensemble et ses caractéristiques propres constituent une barrière majeure contre la mise en place d'une thérapeutique ciblée et efficace. Quels sont les autres neurones ? Comment l'information tactile se propage-t-elle à travers ce circuit ? En combinant des techniques de pointe – imagerie calcique en microscopie multiphotonique, enregistrements électrophysiologiques ciblés – chez des souris exprimant génétiquement un marqueur d'activité neuronale, nous visualiserons en temps réel la dynamique de l'activation de ce circuit et identifierons les neurones impliqués. Les résultats permettront le développement de thérapies spécifiques.

Pour ce projet, l'utilisation de souris transgéniques permettant la visualisation de l'activité neuronale de la moëlle épinière est nécessaire. Aucune méthode alternative n'existe pour prévenir l'utilisation d'animaux dans ce protocole en effet, il est nécessaire de réaliser ces études chez l'animal car l'intégration du toucher et de la douleur implique de nombreux neurones organisés en réseaux complexes et méconnus du système nerveux central et périphérique. Pour chaque animal, nous utiliserons une préparation contenant un segment de peau lié à son nerf cutané relié à son segment de moëlle correspondant. Par conséquent, l'euthanasie de l'animal par injection d'une dose létale de pentobarbital est nécessaire pour réaliser la préparation ex vivo. Le nombre de souris par groupe (n=20) est réduit au maximum tout en permettant de discriminer un effet significatif entre les traitements et calculé par tests statistiques adaptés. Les groupes testés seront des animaux contrôles ou des animaux douloureux chroniques (soit induit par injection sous-cutanée d'un composé appelé "adjuvant complet de Freund" (CFA) pour les douleurs inflammatoires, soit par écrasement d'une racine nerveuse (constriction nerveuse chronique ou CCI) pour les douleurs neuropathiques). Le modèle inflammatoire CFA, largement utilisé au cours de recherches sur les mécanismes de la douleur, provoque l'apparition d'une hypersensibilité cutanée persistante. De même, le modèle CCI mime la constriction chronique nerveuse observées chez de nombreux patients neuropathiques atteints de lésions nerveuses et qui est responsable d'une hypersensibilité dans le, et autour du, territoire lésé.

Le nombre de souris expérimentales est de 60 (20 contrôles, 20 douleurs inflammatoires, 20 douleurs neuropathiques) Chaque préparation animale sera testée par une série de stimulations mécaniques et thermiques ce qui contribue au respect des "R" réduire et raffiner. Nous utiliserons un nombre équivalent d'animaux mâles et femelles en respect de la règle des trois "R" et des directives sur la Recherche Animale. La mise en place technique du projet nécessitera un nombre de 20 souris afin de s'assurer que les modèles de douleur sont maîtrisés pour le personnel recruté, et que la préparation ex vivo est viable et adéquate pour des enregistrements en imagerie calcique et électrophysiologiques. Le nombre total d'animaux pour ce projet est donc de 80 souris adultes. L'étude correspondant à ce projet porte sur la douleur. Par conséquent, l'utilisation d'antalgiques suite à l'établissement du modèle de douleur est proscrit. Cependant, en respect de la règle des trois "R", les animaux seront hébergés en milieu enrichi (social et environnemental) afin de respecter au mieux leur confort et leur niveau de stress. Aucun des modèles de douleurs décrits dans ce projet n'induit de déficit locomoteur sévère pouvant influencer sur les besoins physiologiques de l'animal. De plus, l'expérimentation sera arrêtée si l'animal montre une perte de poids supérieure à 15% suite à un traitement (CFA ou CCI). Enfin, les tests comportementaux à la douleur seront réduits au minimum (fréquence et intensité des tests) et réalisés selon des protocoles expérimentaux établis et acceptés par la communauté scientifique de la Recherche sur la douleur.

15566 L'objectif de ce projet s'inscrit dans l'évaluation d'approches de thérapie génique médiée par des vecteurs viraux pour des maladies génétiques rares du muscle, les dystrophies musculaires. Les calpainopathies sont des maladies génétiques rares et de transmission récessive et sont dues à des mutations d'une enzyme du muscle squelettique appelée calpain 3. Ces pathologies se manifestent vers l'âge de 10-20 ans, touchent principalement les muscles proximaux des ceintures musculaires (scapulaire et pelvienne). Les muscles de la face, ainsi que les muscles respiratoires et cardiaques sont épargnés. Il n'existe pas de traitement à l'heure actuelle. Ce projet vise à évaluer dans le modèle lapin des produits de thérapie tel que le transfert de gène de la calpain 3 en utilisant des vecteurs viraux.

Les deux vecteurs de thérapie génique qui seront évalués et comparés au cours de ce projet ont déjà été sélectionnés parmi une collection de virus (pour lesquels la cassette d'expression ou le sérotype peut varier), pour leur efficacité thérapeutique et l'absence de toxicité dans les doses thérapeutiques chez la souris et le rat.

Le recours au modèle animal est justifié dans le cadre de ce projet car les études de tolérance d'un vecteur ne peuvent se faire qu'*in vivo* car son effet va dépendre de son tropisme par rapport aux organes. Ces expériences représenteront une preuve de concept thérapeutique. Les modèles cellulaires de la maladie ne permettent pas d'étudier les défauts liés à la fonction du muscle (perte de force non mesurable sur des modèles cellulaires) Des modèles *in vitro* ont été utilisés en amont pour tester les transgènes qui correspondent à la version normale du gène déficient dans la pathologie. Cette étude vise également à déterminer la dose optimale provoquant la meilleure expression tissulaire dans le modèle.

Dans une optique de réduction, nous souhaitons réaliser une étude d'innocuité des produits de thérapie génique développés pour ces pathologies avant d'engager une étude complète de toxicologie réglementaire nécessaire dans le cadre d'essais cliniques. La mise en évidence d'une toxicité trop proche de la dose efficace rendrait inutile la réalisation d'une étude réglementaire avec le/les produit(s) considéré(s) puisqu'ils ne seront plus considérés comme susceptible d'être utilisés chez l'homme. L'utilisation de groupes d'animaux sains permettra de s'affranchir du biais lié à la pathologie et donc de réduire la variabilité et par conséquent le nombre d'animaux. De plus, un seul groupe d'animaux uniquement traités avec l'excipient est utilisé pour l'ensemble des groupes, permettant de réduire le nombre d'animaux. Dans ce projet, nous estimons que 25 animaux seront utilisés. Ce nombre est estimé en fonction de nos connaissances actuelles sur ce type d'études ainsi que sur un calcul de taille d'échantillon permettant une analyse statistique des résultats.

Ces études seront menées chez le lapin afin de pouvoir faire des transpositions avec les éventuelles études ultérieures de toxicité réglementaires où cette espèce est utilisée. Un prélèvement de sang au cours de l'étude permettra une analyse de biomarqueurs, ce qui permettra de mieux suivre l'effet des produits sur les animaux. Des mesures adaptées pour réduire le stress seront mis en place. Le bien-être animal sera assuré par de bonnes conditions d'hébergement. Seront mis en place un enrichissement du milieu, un suivi régulier des animaux, l'instauration de points limites pertinents et la mise en place de mesures adaptées si nécessaire, notamment la gestion de la douleur que les animaux pourraient ressentir.

15567 Le projet décrit l'ensemble des procédures expérimentales mises en œuvre chez la Souris dans le cadre de travaux pratiques (TP) de Pharmacologie dispensés à des étudiants de la formation à Bac+2 pour l'obtention du Diplôme Universitaire de Technologie (DUT) spécialité Génie Biologique. Ce diplôme professionnalisant a pour but de former des techniciens supérieurs, assistants ingénieurs se destinant, pour certains, à exercer dans les laboratoires de recherche dans le domaine de la santé humaine et animale.

Le contenu de l'enseignement pratique de Pharmacologie est clairement décrit dans un programme pédagogique national (PPN) publié par arrêté ministériel. Ainsi, le PPN (2013) prévoit l'apprentissage de la manipulation des animaux de laboratoire dans le respect de la réglementation et des règles de bioéthique, la maîtrise des techniques liées à l'expérimentation animale, ainsi que la mise en évidence et la quantification d'une activité pharmacologique *in vivo*. Cette formation permet d'acquérir les bases de l'éthique et des bonnes pratiques de l'expérimentation animale (EA) selon la réglementation en vigueur.

Dans ce projet, ce sont des souris qui sont utilisées pour l'enseignement pratique de Pharmacologie. L'objectif des deux séances de TP est d'étudier les effets de diverses substances pharmacologiques *in vivo* chez la souris vigile par la réalisation de tests comportementaux. En effet, les médicaments testés sont des molécules qui, en agissant au niveau du système nerveux central, induisent des effets psychotropes capables de modifier le comportement des animaux. C'est donc par une approche comportementale que l'activité pharmacologique des médicaments sera révélée et quantifiée chez la souris.

Avant de débiter les TP, un enseignement spécifique consacré au bien-être animal, au respect des règles d'éthique et à la réglementation relative à l'expérimentation animale est dispensé aux étudiants. De plus, la mise en œuvre de chaque procédure est précédée d'une séance d'enseignement dirigé où les différentes étapes pratiques sont commentées à partir de photos et vidéos pour assurer le bon déroulement de l'expérimentation et la bonne prise en charge de l'animal (réduction de l'inconfort et/ou du stress) au cours de la procédure.

Au maximum, un total de 900 souris mâles Swiss sera nécessaire pour les 5 ans à la formation de 280 étudiants. Dans le but de respecter la règle des 3R, le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum puisqu'il est ajusté chaque année sur la base de l'effectif de la promotion tout en permettant l'exploitation des résultats expérimentaux de l'ensemble de la promotion et en respectant le bien-être de l'animal, la procédure expérimentale et l'apprentissage. Le remplacement des animaux à des fins expérimentales ne peut être envisagé puisque l'expérimentation animale est prévue au programme pédagogique national. Dans un objectif de raffinement, le bien-être des animaux est contrôlé tout au long des séances de TP par l'enseignant qui choisira si nécessaire d'interrompre la procédure en cas de stress ou de souffrance ou de manifestations douloureuses observées pendant et après les procédures expérimentales. Les animaux sont également hébergés dans une animalerie aux normes agréée par la Direction Départementale de la Protection des Populations. Enfin, les étudiants sont très largement sensibilisés au bien-être animal et au respect des règles éthiques tout au long de l'apprentissage pratique.

15568 La rectocolite hémorragique (RCH), pathologie du groupe des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) se caractérise par une inflammation chronique du rectum et du côlon épargnant l'intestin grêle. Les patients atteints de RCH présentent une majoration significative du risque de développer un cancer colorectal par rapport à la population générale au cours de leur vie. Ce cancer est alors développé plus jeune que le cancer colorectal non lié au MICI (aussi appelé cancer colorectal sporadique) et le pronostic est souvent moins bon. Le mécanisme physiopathologique de la tumorigenèse chez ces patients n'est pas connu mais l'inflammation chronique du colon et du rectum a été mise en cause.

Il a été démontré récemment dans la littérature que l'appendicectomie augmente significativement le risque de cancer colorectal. Or l'appendicectomie est connue pour diminuer l'activité de la RCH, ce qui remet en cause l'idée que seules l'inflammation chronique dans la RCH et sa sévérité sont responsables du développement des tumeurs. Ce lien entre appendicectomie et majoration du risque de cancer colorectal chez les patients atteints de RCH n'est pas connu à ce jour mais des études rétrospectives vont dans ce sens et suggèrent que l'appendicectomie réduit l'immunosurveillance anti-tumorale dans le contexte de la RCH tout en diminuant l'inflammation colique. Notre hypothèse est que l'effet anti-inflammatoire et pro-tumoral (induisant un cancer colorectal) de l'appendicectomie dans un contexte de colite chronique puisse être médié par une inflammation du gros intestin au niveau de l'insertion de l'appendice aussi appelé caecum générée par le geste opératoire lors de l'appendicectomie et/ou par une diminution du recrutement lymphocytaire (les lymphocytes sont responsables de l'inflammation chronique) dans la muqueuse colique et dans les tumeurs.

Notre objectif principal est d'étudier l'effet de l'appendicectomie et de l'inflammation du colon sur l'immunité antitumorale dans le cancer du côlon en situation de colite chronique. Notre programme consistera à mieux définir sur le plan immunologique l'implication de l'appendice dans la protection contre le cancer et l'inflammation. Pour cela, nous utiliserons un modèle murin de cancer colorectal sur colite chronique induite chimiquement. Les animaux seront opérés sous anesthésie générale soit pour réaliser une appendicectomie soit pour induire une inflammation temporaire et contrôlée du caecum. Un suivi post opératoire quotidien sera réalisé et tout signe d'inconfort conduira soit à une administration d'antalgique soit à l'euthanasie de l'animal si l'inconfort est trop important. Puis, la tolérance de la colite induite sera surveillée avec attention et les souris seront pesées tous les jours dès le troisième jour de traitement c'est à dire avant l'inflechissement de la courbe de poids avec un examen clinique à la recherche de signes de douleurs. L'intensité de la colite sera évaluée par un score standardisé validé permettant de guider les antalgiques à administrer ainsi que de

décider d'euthanasier l'animal en cas de colite trop intense. Par ces expériences, nous pourrions identifier les différentes populations immunitaires mise en jeu dans cette immunité anti-cancer médiée par l'appendice. En parallèle, les effets de médicaments utilisés ou en cours d'essai dans la RCH tels que les anti-intégrines et les modulateurs de la circulation lymphocytaire sur la colite chronique et la tumorigenèse seront évalués. Ces traitements seront injectés deux fois par semaine dans la cavité abdominale, qui représente une voie d'injection simple et très peu invasive. Des recueils de selles seront effectués afin d'analyser de potentielles modifications du microbiote. Les souris seront sacrifiées à un stade asymptomatique du cancer avant que le phénotype ne devienne dommageable. Le protocole global se déroulera sur une période de trois ans et justifiera de 360 animaux permettant de constituer les différents groupes nécessaires en fonction de l'intervention chirurgicale réalisée, du traitement administré (aucun ou anti-intégrines ou modulateur de la circulation lymphocytaire) et des différentes chronologies étudiées (post-opératoire immédiat ou effet sur la colite chronique avant l'apparition de lésion néoplasique ou effet sur la tumorigenèse secondaire à la colite chronique).

La règle des 3R a été prise en compte dans le projet proposé

- Remplacer La tumorigenèse induite par l'inflammation colique chronique est multifactorielle et médiée par différents mécanismes complexes comme la dysimmunité (altération du système immunitaire) et l'infection (microbiote). Aucun modèle cellulaire ne permet de reproduire de façon fiable cette complexité. La souris est le plus petit animal adapté à ce travail sur l'inflammation colique avec une littérature valide justifiant ce choix.
- Réduire Nous avons réduit le nombre de souris utilisées au minimum nécessaire et suffisant pour valider scientifiquement notre étude du point de vue de l'analyse statistique.
- Raffinement Les souris seront opérées sous anesthésie générale afin d'éviter toute souffrance ou douleur de l'animal. Cette anesthésie consistera en l'inhalation d'isoflurane durant toute l'intervention chirurgicale. Les souris seront surveillées quotidiennement en post-opératoire par un score standardisé. Ce score correspond à une grille d'évaluation clinique permettant de prendre les mesures nécessaires et progressives en fonction de l'élévation du score (augmentation de la fréquence des observations, administration de solution saline pour lutter contre la déshydratation, administration d'anesthésiant pouvant être renouvelé toutes les 12h, euthanasie précoce). L'environnement des animaux sera enrichi afin de leur permettre d'avoir un comportement le plus naturel possible (cotons, maison,) En fin de procédure, l'ensemble des animaux utilisés sera euthanasié.

15569 Le cancer du sein triple-négatif (CSTN) est défini par l'absence d'expression des récepteurs hormonaux et de l'expression et ou l'amplification d'HER2. C'est le sous-type de cancer du sein le plus agressif et son mauvais pronostic est dû, en partie, au manque d'options thérapeutiques. L'identification très précoce des patientes résistantes à la chimiothérapie néoadjuvante, peut permettre une réadaptation thérapeutique et ainsi améliorer leur pronostic. L'objectif de ce projet sera de développer un nouveau radiotraceur ciblant l'Human Epidermal growth factor Receptor 3 (HER3), récepteur impliqué dans les mécanismes de résistance des CSTN. Ce type d'imagerie moléculaire permettrait de fournir une cartographie tumorale de l'expression de HER3 et d'anticiper un potentiel mécanisme de résistance afin de réadapter, au besoin, la stratégie thérapeutique.

Le projet se compose de trois études. Tout d'abord, une étude de mise au point des modèles *in vivo* permettra de caractériser la pousse tumorale et de quantifier l'expression de la protéine HER3. Puis, une étude d'imagerie des molécules radiomarquées sera réalisée sur des modèles murins porteurs de tumeurs pour sélectionner, parmi les 14 radiotraceurs candidats, les vecteurs possédant le meilleur potentiel *in vivo* pour la reconnaissance de la protéine HER3. Enfin, une étude de biodistribution sera réalisée sur les deux radiotraceurs les plus prometteurs.

Le nombre d'animaux inclus dans ce projet a été optimisé conformément à la règle des 3Rs (Remplacement, Réduction, Raffinement). L'ensemble du projet comprendra 760 souris Nudes femelles sur 5 années. Ce nombre a été calculé afin de garantir une valeur statistique à l'étude menée. En effet, de nombreuses études *in vitro* réalisées en amont ont permis de remplacer

l'utilisation des animaux. Cependant, ces études sur cellules ne peuvent pas se substituer aux études sur un organisme entier afin d'évaluer les effets potentiellement indésirables sur d'autres organes d'une nouvelle thérapie. Au cours de ce projet, le nombre d'animaux nécessaire est réduit au maximum en sélectionnant uniquement les expérimentations essentielles. La surveillance quotidienne des animaux permettra de déceler les premiers signaux de stress, de douleurs ou d'inconfort pour l'animal qui pourront être améliorés par l'administration d'antalgiques avant l'atteinte des points limites définis. Les conditions d'hébergement seront optimisées (portoirs ventilés, température, hygrométrie, luminosité, densité animale, enrichissement de milieu avec coton pour la nidification, bâtonnet de bois pour ronger et cabane de cachette).

15570 La hernie congénitale de coupole diaphragmatique est une malformation rare avec une incidence de 1/3000 naissances. Le diagnostic est posé, dans plus de 80% des cas, lors du dépistage échographique prénatal. La gravité de cette pathologie réside dans l'atteinte respiratoire qui est responsable de 30 à 50% de décès néonataux. Des outils pronostiques de la fonction pulmonaire sont nécessaires au conseil prénatal afin d'orienter au mieux la prise en charge. Aujourd'hui le seul élément disponible est un critère morphologique il s'agit de la mesure du volume pulmonaire fœtal. Ce facteur reste cependant insuffisant pour prédire le niveau de l'atteinte pulmonaire et le degré de l'insuffisance respiratoire après la naissance. Le but de ce travail est d'évaluer par une technique d'imagerie non invasive - l'IRM BOLD (Blood Oxygen Level Dependent Imaging, ou Imagerie dépendante du niveau d'oxygène sanguin), une méthode d'imagerie fonctionnelle - la qualité fonctionnelle pulmonaire chez le fœtus dans le cadre de la hernie de coupole diaphragmatique.

Il s'agit d'une première étude exploratrice chez l'animal pour laquelle il n'y a aucune donnée préliminaire. Pour pouvoir analyser le lien entre les données de l'imagerie BOLD et les lésions pulmonaires en histologie, nous avons choisi d'étudier un modèle de hernie de coupole diaphragmatique chez le fœtus de la rate gestante.

La procédure consiste en l'ingestion d'un herbicide tératogène, au 9ème jour de gestation. Quinze rates gestantes recevront cet herbicide, et cinq autres seront témoins et n'ingéreront uniquement que de l'huile. L'imagerie IRM sera réalisée 12 jours après l'ingestion, c'est-à-dire au 21ème jour de gestation pour les 2 groupes de rates, soit 20 rates gestantes et 8 foetus par rate en moyenne soit 180 animaux au total pour un projet d'une durée de 2 ans. Ces procédures ont été ajustées au nombre minimal d'animaux nécessaires, en vue d'analyser des résultats cohérents. L'état général et le comportement des rates seront évalués de manière pluri-quotidienne à l'animalerie

L'IRM se déroulera sous anesthésie générale réalisée au masque. A la suite de l'acquisition des images IRM (au 20ème jour de gestation), une césarienne sera pratiquée sur les rates toujours sous anesthésie générale, afin d'en extraire les fœtus pour analyse.

Cela nous permettra de comparer l'effet BOLD mesuré sur les poumons des fœtus avec leurs caractéristiques morphologiques et histologiques, et donc d'envisager à terme l'utilisation de l'IRM BOLD chez les fœtus humains présentant des hernies de coupole diaphragmatique afin d'en améliorer l'évaluation pronostique et le conseil prénatal.

15571 Les défauts génétiques de la dystrophine, protéine du muscle strié, peuvent conduire soit à la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) soit à la dystrophie musculaire de Becker (BMD) en fonction du niveau d'atteinte. Ce sont des maladies génétiques rare liées au chromosome X. Elles se manifestent par une faiblesse musculaire progressive puis une perte de la marche avec un degré de sévérité plus important dans la DMD. L'atteinte des muscles cardio-respiratoires est la cause majeure de mortalité et morbidité dans la DMD. A l'heure actuelle, un seul traitement a été approuvé sous conditions par la Food and Drug Administration (FDA) mais ne concerne qu'une partie des patients. Le besoin thérapeutique reste réel.

Un des objectifs de notre équipe de recherche est de proposer de nouvelles approches thérapeutiques pour la DMD/BMD. Plusieurs modèles murins déficient en dystrophine sont disponibles. Cependant, le tableau clinique reste modéré et peu progressif. Nous avons généré un modèle chez le rat avec une modification correspondant à une région du gène fréquemment modifié chez les patients. La caractérisation initiale a permis de mettre en évidence une atteinte

dystrophique au niveau des muscles squelettique et cardiaque. Ce modèle rat, contrairement à la souris qui ne présente que très peu d'atteinte cardiaque et uniquement à un âge tardif, présente un phénotype plus proche du tableau clinique chez l'homme. Ce point est d'importance capitale pour l'évaluation des approches thérapeutiques au niveau de la possibilité de correction du phénotype cardiaque.

Ce projet vise à évaluer différentes approches de thérapie génique et d'édition du génome dans un modèle rat déficient en dystrophine afin d'évaluer l'impact sur la restauration du phénotype des animaux au niveau histologique et fonctionnel au niveau des muscles squelettiques et cardiaques dans une perspective de futures applications à l'Homme. Le nombre d'animaux prévus dans ce projet est de 212.

Remplacement : Ce projet a recours au modèle animal et au modèle rat en particulier pour les raisons principales suivantes on ne sait pas modéliser aujourd'hui la distribution d'un traitement de thérapie génique ou d'édition du génome dans un organisme sans le tester dans un organisme vivant. Deuxièmement, l'effet bénéfique d'un traitement sur un phénotype dystrophique au niveau histologique et au niveau fonctionnel va nécessiter une évaluation au niveau de l'organe atteint, en l'occurrence le muscle squelettique différencié et le cœur.

Réduction : Les protocoles d'études seront réalisés en incorporant le juste nombre d'animaux nécessaire pour pouvoir tirer des conclusions. Une étude préalable de caractérisation a été réalisée permettant de définir le niveau d'atteinte et les caractéristiques des animaux. Les animaux contrôles seront mutualisés entre les procédures chaque fois que possible. Pour certaines études, les échantillons contrôles viendront des muscles controlatéraux pour les témoins non injectés et de protocoles antérieurs pour les témoins sauvages.

Au total, 212 rats seront utilisés dans cette étude.

Raffinement : Des prélèvements de sang au cours de l'étude permettront une analyse de biomarqueurs destinée à mieux suivre l'effet des produits sur les animaux dans le temps. Tous les prélèvements de sang seront pratiqués sous anesthésie gazeuse.

Des mesures adaptées pour réduire le stress seront mises en place. En particulier, les rats étant des animaux sociaux, aucun rat ne sera seul dans une cage. Une phase d'acclimatation de 7 jours sera mise en place avant l'entrée en protocole.

Concernant les injections des produits thérapeutiques en intramusculaire, elles seront elles-aussi réalisées sous anesthésie gazeuse.

15572 L'objectif du projet est d'évaluer les effets protecteurs des extraits de deux plantes médicinales de La Réunion contre les complications vasculaires associées à une ischémie cérébrale chez un modèle de souris obèses et diabétiques.

L'Organisation Mondiale de la Santé définit le diabète comme étant une maladie métabolique caractérisée par une hyperglycémie chronique. Le diabète de type 2, qui se traduit par une insulino-résistance, est la forme la plus fréquente et représente plus de 90% des cas de diabète traité pharmacologiquement à La Réunion. Celui-ci, majoritairement lié à l'obésité, est caractérisé par le dépôt de graisses au niveau des cellules endothéliales qui tapissent la paroi des vaisseaux sanguins. Au niveau cérébral, il est connu que l'hyperglycémie provoque d'importantes dérégulations des cellules endothéliales en induisant une augmentation du stress oxydant, de l'inflammation ainsi qu'une perte d'étanchéité de la barrière hémato-encéphalique. Ces événements délétères induits par l'hyperglycémie participent au déséquilibre de l'homéostasie cérébrale et augmentent le risque d'accident vasculaire cérébral (AVC), qui est la première cause de handicap chez l'adulte. A ce jour, il demeure un manque crucial de stratégies adaptées pour lutter contre les complications cérébrovasculaires induites par l'hyperglycémie en situation diabétique.

De manière intéressante, les données de la littérature démontrent les effets antioxydants, anti-inflammatoires, hypoglycémisants et hypolipémisants des polyphénols végétaux. Des études récentes réalisées au laboratoire sur un modèle *in vitro* de cellules endothéliales cérébrales ont démontré les effets protecteurs des polyphénols extraits de deux plantes médicinales réunionnaises. Ces deux plantes inscrites à la Pharmacopée Française et riches en polyphénols ont en effet montré des

capacités antioxydantes, anti-inflammatoires et non-cytotoxiques sur des modèles cellulaires *in vitro*. Le projet présenté ici aura pour but d'évaluer l'effet protecteur des polyphénols extraits de ces deux plantes médicinales sur un modèle de souris obèses et diabétiques soumises à un AVC expérimental. Pour ce faire, 88 souris C57BL6 mâles seront utilisées. Le principal dommage est le recours au modèle animal avec des complications ostéoarticulaires potentiellement induites par le régime riche en graisses. L'avantage de ce modèle est de permettre de mimer les dérégulations métaboliques associées à l'obésité. Nous serons particulièrement vigilants sur le respect de la règle universelle des 3R. Concernant la notion de remplacement, le recours à l'expérimentation sur des animaux vivants est indispensable car il est impossible de reproduire une étude nutritionnelle sur des modèles *in vitro* simplifiés. Nous avons besoin de toute la complexité vasculaire et inflammatoire d'un organisme vivant pour mimer la physiopathologie humaine. Concernant la notion de réduction, le nombre d'animaux est réduit au maximum en fonction des taux de mortalité associés aux différentes procédures expérimentales. L'application de la politique de réduction des 3R permet d'optimiser au mieux chaque expérimentation afin de retirer d'un minimum d'animal un maximum d'informations. Concernant le raffinement, les procédures expérimentales seront réalisées par des personnes qualifiées et habilitées à manipuler les animaux dans des conditions optimales. Nous veillerons à ce que les animaux bénéficient d'un accès facilité à la nourriture et à l'eau et d'un enrichissement de leur environnement afin de limiter leur stress et anxiété.

15573 La transplantation d'organe consiste à remplacer un organe non fonctionnel par un organe provenant d'un donneur (vivant ou décédé) de la même espèce mais génétiquement différent. Un des principaux risques après une transplantation est le rejet de l'organe greffé. Celui-ci résulte de la capacité du système immunitaire du receveur à reconnaître comme étranger le tissu transplanté. Actuellement, on considère que les lésions de rejet sont principalement le fait des effecteurs de l'immunité adaptative, spécifiques du greffon les lymphocytes T et les anticorps dirigés contre le greffon. Les lésions causées par les anticorps sont considérées actuellement comme la première cause de perte des greffons. La voie classique de production des anticorps dépend uniquement des cellules du receveur de la greffe.

Récemment, il a été mis en évidence, dans un modèle de transplantation cardiaque, une nouvelle voie permettant la génération d'anticorps et impliquant les lymphocytes T du donneur contenus dans le greffon au moment de la transplantation. Cependant, cette production d'anticorps ne survient qu'avec les cœurs de certains donneurs. En effet, les lymphocytes T d'autres donneurs sont très rapidement éliminés par le receveur et ne survivent donc pas suffisamment longtemps chez le receveur pour permettre la production d'anticorps par cette voie.

Ce projet vise à montrer que les cellules de l'immunité innée (non spécifiques du donneur) du receveur sont capables d'être tolérantes vis-à-vis des lymphocytes T de certains donneurs, alors qu'elles peuvent éliminer les lymphocytes T d'autres donneurs.

Pour réaliser ce projet, il est prévu d'injecter des cellules par voie intraveineuse à des souris, après anesthésie, et de suivre la survie de ces cellules en modulant la réactivité des cellules de l'immunité innée à leur égard. Auparavant, certaines souris auront reçu des injections intra-péritonéales d'un agent permettant de supprimer spécifiquement certaines cellules de l'immunité innée. La lyse des cellules injectées sera analysée. Ce projet devrait permettre d'acquérir des données nouvelles pour aider à prévenir l'apparition d'anticorps après transplantation d'organe, limiter leurs effets délétères sur les greffons et augmenter la durée de vie des greffons. Il s'agit d'un objectif prioritaire en transplantation compte tenu de la pénurie d'organe.

Ce projet ne peut être mené sans l'utilisation d'animaux car le système immunitaire est un système biologique extrêmement complexe comportant un nombre important de cellules en mouvement, ce qui est impossible à reproduire *in vitro*. Ces animaux seront soumis à différentes injections et à des prélèvements sanguins, sous anesthésie générale.

Des calculs d'effectifs ont permis d'établir le nombre minimal d'animaux par groupe pour que les résultats soient significatifs. L'ensemble des gestes douloureux sera réalisé sous anesthésie générale. Le bien-être des animaux sera analysé et pris en compte tout au long du protocole.

Au total, le nombre d'animaux nécessaires à ce projet est de 126 souris (*Mus musculus*).

15574 Le COVID-19, acronyme pour coronavirus disease 2019, est une maladie respiratoire détectée pour la première fois en décembre 2019 dans la province de Wuhan en Chine et qui s'est rapidement propagée dans le monde entier. Cette maladie est causée par le nouveau virus SARS-COV-2 (syndrome aigu respiratoire sévère, coronavirus 2). En plus de l'atteinte respiratoire, certains patients atteints de COVID-19 ont également présenté des signes neurologiques tels que l'anosmie, l'agueusie et d'autres signes du système nerveux central tels que maux de tête, nausées, désorientation et vomissement. Des preuves de plus en plus nombreuses montrent que certains coronavirus ne sont pas toujours confinés aux voies respiratoires et qu'ils peuvent également envahir d'autres tissus tel que le cerveau soit par le tronc olfactif, soit par le tronc cérébral via les connexions synaptiques à partir du poumon et des voies respiratoires. On ignore encore si le SARS-COV-2 est neurotrope et la voie exacte qu'il pourrait emprunter pour atteindre des centres cérébraux précis. Les processus de pathogenèse associés restent inconnus. L'étude du neurotropisme et des mécanismes résultants des attaques du tronc cérébral sera un atout pour le développement et la validation d'approches thérapeutiques innovantes pour le COVID-19.

Afin d'étudier la neuroinvasion et la dissémination du SARS-COV-2 dans le système nerveux central, le laboratoire utilisera des modèles rongeurs reconnus dans le domaine de la physiopathologie de l'infection par le SARS-CoV-2, tels que le hamster doré syrien (*Mesocricetus auratus*) adulte ainsi que des souris (*Mus musculus*, BALB/c et C57BL/6) génétiquement modifiées exprimant le récepteur ACE2 humain adulte.

Les répercussions de l'inoculation sur la santé des animaux, notamment l'impact sur leur système nerveux, leur activité locomotrice, leurs capacités motrices, olfactives et mnésiques seront aussi étudiées. Enfin l'activité potentielle de molécules antagonistes de l'entrée du virus seront analysés sur l'issue de l'infection dans les 2 modèles de rongeur.

Ces expérimentations suivent la règle des 3R

Remplacement ces expériences viennent compléter des expérimentations effectuées sur culture cellulaire et ne sont utilisées que lorsqu'elles représentent une étape incontournable pour l'avancement de la connaissance scientifique et non actuellement remplaçable par des tests *in vitro*.

Raffinement l'ensemble des procédures sera réalisé de manière à limiter la douleur, la souffrance des animaux (anesthésie,) et l'angoisse (plusieurs souris ou hamster par cage, mise en place d'enrichissement sous la forme d'igloo, de coton,). Enfin, des points limites sont clairement définis et permettent d'éliminer toute souffrance inutile. Si des animaux deviennent malades et atteignent les points critiques, ils seront mis à mort.

Réduction l'analyse des résultats utilise des tests statistiques (ANOVA à 1, 2 ou 3 facteurs) permettant de comparer dans les règles de l'art les données qualitatives ou quantitatives obtenues et limitant le nombre d'animaux au strict nécessaire d'après notre expérience 310 hamsters et 360 souris.

La durée du projet est de 5 ans.

L'utilisation des animaux est décrite au sein de 6 procédures expérimentales, 5 de classe modérée et 1 de classe légère.

15575 Les cancers sont aujourd'hui la première cause de décès en France, et des modalités thérapeutiques innovantes doivent être proposées. Dans ce contexte, l'un des développements les plus intéressants dans le domaine des thérapies anticancéreuses est celui des anticorps monoclonaux dont l'efficacité clinique est maintenant prouvée depuis les années 80, conduisant à une utilisation thérapeutique de plus en plus large d'anticorps d'anticorps.

Les anticorps monoclonaux ont de multiples applications en recherche et en diagnostic, en clinique humaine, en exploitant la reconnaissance de protéines en biologie, ou encore peuvent être utilisés comme médicaments. Le but de ce projet est de générer des anticorps monoclonaux chez la souris contre un antigène donné lequel est impliqué dans un processus pathologique humain. Les

anticorps générés chez l'animal seront ensuite testés dans des modèles *in vitro* pour valider la cible dans une approche d'immunothérapie.

Compte tenu de la complexité des anticorps, les méthodes substitutives actuelles ne permettent pas la production de novo d'anticorps dirigés contre un antigène précis répondant aux critères des projets thérapeutiques. Ce projet couvre l'utilisation de souris dans le cadre de protocoles d'immunisation. Ces protocoles d'immunisation correspondent classiquement à deux injections par voie intrapéritonéale et un prélèvement sanguin en fin d'étude entraînant des contraintes légères à l'animal (contention, piqûre). Les protocoles nécessitant des injections multiples sont réalisés sous anesthésie générale. Les animaux sont observés quotidiennement et toute perte de poids ou signe clinique (d'apparition très rare) sont pris en charge par l'équipe vétérinaire et le responsable de l'étude. De plus, une attention particulière est apportée aux conditions d'hébergement et à l'enrichissement du milieu.

Le nombre d'animaux utilisés a été optimisé afin de produire un pool d'anticorps de qualité et de diversité requise pour la sélection des meilleurs anticorps thérapeutiques. Il est anticipé un nombre de 100 études sur la période du projet à raison de 1 à 3 groupes / étude et de 2 à 5 d'animaux par groupe. Nous prévoyons ainsi l'utilisation de 1500 souris pour la mise en œuvre de ce projet.

15576 L'épilepsie est la troisième maladie neurologique la plus fréquente en France. Elle touche environ 0,5 à 1% de la population mondiale et s'installe pour 75 % des cas avant 18 ans.

La crise d'épilepsie est une manifestation clinique liée à l'activation subite, simultanée et anormalement soutenue d'un nombre très important de cellules nerveuses du cerveau. Elle peut se manifester ou non par des mouvements saccadés / convulsions et s'accompagner d'une diversité de symptômes comme par exemple des troubles de l'humeur ou de la mémoire.

C'est pour cela que l'on parle maintenant de syndromes épileptiques. Les traitements actuels restant inefficaces pour plus d'un tiers des malades, il est indispensable de continuer les recherches visant à mieux comprendre les mécanismes moléculaires associés aux syndromes épileptiques.

Ce projet vise à créer un modèle de souris d'un syndrome de l'épilepsie. Cette lignée de souris transgénique possèdera une mutation de 2 gènes dont un est déjà connu pour être impliqué dans cette pathologie chez l'homme. Les mutations seront restreintes au cerveau. La création de ce modèle nous permettra ensuite d'étudier chez ces animaux le développement du cerveau, l'activité des neurones et les mécanismes moléculaires impliqués dans certaines formes d'épilepsie. Ce modèle pourra aussi nous aider à développer de nouvelles cibles pharmacologiques.

Règle des 3R.

Remplacer Ce projet s'intègre dans un projet plus global combinant différents travaux de recherche complémentaires allant de l'étude biochimique ou bio moléculaire au comportement. Beaucoup d'études « in-vitro » sont donc effectuées en amont de l'utilisation de lignées d'animaux pour limiter au maximum leur utilisation. Pour autant, le seul modèle animal de l'épilepsie, suffisamment caractérisé à ce jour, reste le modèle murin transgénique. Par conséquent, nous pensons qu'il n'existe pas de remplacement disponible à notre modèle expérimental qui permettrait d'atteindre les objectifs scientifiques du travail proposé.

Raffiner Les mutations n'affecteront que le cerveau sans toucher le reste de l'organisme. Cela réduit considérablement les effets défavorables sur le développement (décès précoces) et le bien-être animal (déficits locomoteur par exemple). Pour supprimer l'angoisse ou la détresse des animaux au cours de la procédure, les animaux sont élevés en cage collective enrichie et des points limites suffisamment précoces ont été mis en place.

Réduire Pour limiter au maximum le nombre d'animaux, un minimum de 3 et 6 trios de souris (1 mâle et 2 femelles par cage) seront utilisés pour produire la génération de souris désirée. Ensuite, pour maintenir la lignée, seulement 2 trios seront hébergés en continu et cela sur 5 ans. Nous avons estimé le nombre total d'animaux nécessaire à la création d'une seule lignée de souris transgénique (la lignée cKO Prickle2/Scribble1) est de 129 souris plus 120 souris pour maintenir la lignée sur 5 ans, soit 249 animaux.

15577 L'obésité et ses complications métaboliques comme l'insulinorésistance et le diabète de type 2 (DT2) sont des problèmes de santé majeurs. L'obésité résulte principalement d'un déséquilibre entre apport et dépense énergétique entraînant une augmentation du stockage des lipides dans les adipocytes présents dans les tissus adipeux blancs. Contrairement à ces adipocytes blancs, les adipocytes bruns présents dans le tissu adipeux brun sont des cellules impliquées dans la dissipation de l'énergie sous forme de chaleur processus appelé thermogénèse non frissonnante. De plus, dans les tissus adipeux blancs sous-cutané coexistent avec les adipocytes blancs qui stockent les lipides, des adipocytes beiges qui comme les bruns, sont capables de dissiper de l'énergie sous forme de chaleur et dont le nombre augmente lorsqu'il y a des besoins thermogéniques. L'obésité entraîne des anomalies de fonctions des adipocytes thermogéniques bruns et beiges et la réactivation de ces adipocytes et/ou l'augmentation du nombre des adipocytes beiges permet de corriger les anomalies métaboliques (insulinorésistance/DT2) associées à l'obésité. Il existe cependant des lacunes importantes dans la compréhension des mécanismes et dans l'identité des facteurs qui régulent l'activité et/ou la formation des adipocytes thermogéniques bruns et beiges. Il a été récemment montré que ces adipocytes thermogéniques sont des cellules mécano-sensibles suggérant que des protéines activées par des stimulations mécaniques puissent contribuer au contrôle des fonctions biologiques de ces cellules. Nous avons récemment découvert que les adipocytes bruns expriment en grande quantité un canal ionique mécano-sensible fonctionnel. L'objectif de ce projet est de déterminer le rôle de ce canal ionique mécano-sensible dans la fonction et le développement des adipocytes thermogéniques bruns et beiges et d'évaluer si son absence dans ces adipocytes thermogéniques conduit au développement de l'obésité et de ses complications métaboliques, en particulier l'insulinorésistance et le DT2. Pour cela nous générerons des souris n'exprimant plus ce canal ionique mécano-sensible uniquement dans les adipocytes bruns et beiges. Nous étudierons l'impact de l'absence de cette protéine dans ces adipocytes sur le développement de l'obésité induite par un régime riche en lipide et sur le développement de l'insulinorésistance et du DT2. Nous déterminerons si cette protéine contrôle *in vivo* le développement et/ou la fonction de ces adipocytes thermogéniques.

Pour satisfaire au remplacement, nous avons réalisé des expériences *in vitro* suggérant que ce canal mécano-sensible contrôle le développement/fonction des adipocytes thermogéniques. Il est nécessaire cependant de réaliser des études sur l'animal pour déterminer si cette protéine est impliquée dans la fonction et le développement des adipocytes thermogéniques bruns et beiges et pour évaluer son rôle au sein de ces adipocytes thermogéniques pour le développement de l'obésité et de ses complications métaboliques. En effet, il n'existe pas de méthodes alternatives à l'expérimentation chez l'animal permettant de mimer *in vitro* toute la complexité biologique et toutes les interactions existantes entre organes participant au développement de l'obésité et de ses complications. Pour satisfaire à la réduction, chaque procédure prévoit d'utiliser le nombre minimum d'animaux nécessaire à des études statistiques pertinentes. Ce nombre a été déterminé en se basant sur notre expertise dans les méthodes expérimentales utilisées dans chacune des procédures et en utilisant le logiciel G*Power grâce aux caractéristiques statistiques de chacune des variables étudiées et de l'effet attendu. Pour l'ensemble du projet nous utiliserons au maximum 1248 souris mâles dans 5 procédures pour 5 ans. Pour satisfaire au raffinement, l'hébergement sera réalisé dans des locaux appropriés, avec un enrichissement systématique, les personnes réalisant les différentes procédures respecteront les règles d'éthiques. L'isolement des souris lorsqu'il est indispensable ne sera réalisé que pour une durée limitée. L'invalidation de Piezo1 sera restreinte aux adipocytes thermogéniques limitant ainsi le risque de phénotype dommageable. Le régime riche en graisses que nous utilisons n'induit que les premières phases qui peuvent conduire au DT2, et n'induit pas de glycosurie (présence de glucose dans les urines) entraînant une perte de poids. Le régime riche en graisses n'est donc pas dommageable pour nos souris. Les expériences que nous allons utiliser pour tester les altérations métaboliques de la souris sont peu invasives. Les expériences que nous allons utiliser pour tester la fonction thermogénique des souris n'affectent que faiblement les conditions de vie des souris puisqu'il s'agit d'une mesure non invasive grâce à l'utilisation d'une caméra thermique. Dans tous les cas, des points limites précoces ont été établis pour chaque expérience afin de faire face à un incofort potentiel pour l'animal. Bien qu'aucune des procédures ne devraient engendrer a priori de souffrance particulière, nos surveillances régulières

nous permettront d'identifier d'éventuelles souris souffrantes et une grille d'observation avec conduite à tenir a été mise en place pour prendre rapidement les décisions qui s'imposent dans ce cas.

L'ensemble des procédures d'expérimentation chez l'animal décrites dans ce projet sont pour une durée de 5 ans et permettront de mieux comprendre la mécanobiologie des adipocytes thermogéniques et pourrait permettre de proposer ce canal ionique mécano-sensible comme une future cible pour des médicaments visant à augmenter la fonction et/ou le nombre des adipocytes thermogéniques bruns et beiges pour lutter contre l'obésité et ses complications métaboliques.

15578 Le sepsis et les pneumopathies bactériennes représentent des défis majeurs de santé publique et constituent la troisième cause de décès dans les pays industrialisés. Après guérison, il perdure une cicatrice immunologique rendant l'organisme plus tolérant aux agressions futures. Cette tolérance est responsable d'infections bactériennes secondaires nosocomiales et de réactivations virales grevant le pronostic des patients, augmentant leur durée de séjour hospitalier et générant un surcoût important pour la société. Sur le long terme, la persistance de cette tolérance pourrait favoriser la survenue de cancers.

Les lymphocytes T mémoires (Tmem) sont des lymphocytes qui restent dans l'organisme suite à une agression type infection même lorsque cette dernière est résolue afin que l'organisme garde une trace de cet épisode. Ainsi lors d'une rencontre future avec le même antigène, l'organisme sera capable de répondre plus rapidement et plus fortement à cette nouvelle agression.

Le but de notre travail sera d'évaluer l'impact de cette cicatrice immunitaire post-infection (sepsis projet 1 et pneumopathie projet 2) sur

1- la modification de la réponse T mémoire lors de la 2ème rencontre avec l'antigène.

2- la modification de la création de cette réponse T mémoire lors de la 1ère rencontre contre l'antigène.

Au total, ce projet nécessitera 1780 souris C57BL/6JRj (« B6 »), 180 souris OT-I/Ly5.1 (« OT-I ») et 240 souris Foxp3DTR (C57BL/6-Tg(Foxp3DTR/EGFP)23.2Spar/Mmjax) (« DEREG »), soit un total de 2200 souris. L'utilisation d'animaux pour l'évaluation du rôle de l'infection sur la fonction des Tmem ou leur génération nous permettra d'apporter de nouveaux éclairages dans la lutte contre le cancer et dans les processus de vaccination. Remplacement Les paramètres étudiés dans ce travail ne peuvent être aujourd'hui remplacés par des procédures *in vitro*. Réduction Le nombre de souris a été réduit au minimum afin de garder une analyse statistique fiable et ce nombre a été optimisé en fonction des expériences précédentes. Raffinement Pour leur confort, les animaux seront hébergés dans des cages adaptées (groupe de 5 max), avec enrichissement (frisottis et ou dôme) et accès libre à l'eau et à la nourriture. De façon à diminuer le stress, la souffrance et la douleur, les animaux seront sous anesthésie générale et un traitement analgésique leur sera donné de façon adaptée en fonction de la procédure réalisée. Le bien-être des animaux est surveillé tout au long de l'étude avec évaluation quotidienne des signes généraux. Une grille d'appréciation a été mise en place avec un système de barème de point afin de minimiser au maximum l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'angoisse des souris et d'obtenir les informations pertinentes à moindre coût en termes de "bien-être" animal.

15579 Le vitiligo est une pathologie de la peau caractérisée par l'apparition de taches blanches au niveau du corps. Elle touche 1% de la population, elle est très stigmatisante et entraîne des problèmes sociaux et psychologiques majeurs chez les patients atteints. Cette maladie dermatologique est associée à une perte de mélanocytes (cellules à l'origine de la pigmentation de la peau) au niveau de l'épiderme. Cette maladie ne dispose pas à ce jour de traitement efficace et il paraît important de tester de nouvelles cibles thérapeutiques. Dans ce modèle d'étude, nous souhaitons tester les effets d'un nouveau traitement déjà identifié au laboratoire (un inhibiteur de la cytokine IL-15) à des doses non nocives chez la souris développant un vitiligo afin de se placer dans un contexte ressemblant à la pathologie chez l'homme.

Chez l'humain, les mélanocytes sont localisés à la base de l'épiderme et au niveau des poils, c'est la raison pour laquelle les humains ont des peaux de plusieurs couleurs dont certaines très noires.

Chez la souris sauvage, les mélanocytes sont localisés principalement au niveau du pelage ce qui se traduit par des poils noirs sur une peau claire. Afin de développer un modèle murin de vitiligo ressemblant à la pathologie humaine, nous proposons d'utiliser une lignée de souris transgénique dont la peau est de couleur noire, caractérisée par la présence de mélanocytes localisés au niveau de la base de l'épiderme et du pelage.

Le modèle souris que nous proposons d'utiliser a été préalablement validé par des chercheurs et publié dans la littérature Il est basé sur la stimulation du système immunitaire (système des défenses de l'organisme) contre des éléments du mélanocyte par différentes étapes 1/ injection sous cutanée d'un fragment de protéine (peptide) constituante des mélanocytes de la peau afin de sensibiliser le système immunitaire contre les mélanocytes, puis 2/ injection sous cutanée d'adjuvants naturels afin d'augmenter la réponse immune. Ces étapes permettent ainsi d'activer une réponse inflammatoire contre les mélanocytes de façon importante et d'induire une dépigmentation des souris. Les réponses cellulaires mises en jeu dans la dépigmentation des souris sont très semblables à celles décrites comme participant à la dépigmentation de malades atteints de vitiligo.

Les souris ayant développé une dépigmentation peuvent ensuite être utilisées comme modèle murin de vitiligo afin de tester différentes thérapeutiques pour évaluer si celles-ci permettent de bloquer la dépigmentation et/ou permettent la re-pigmentation des souris.

Nous utiliserons le minimum d'animaux nécessaire pour réaliser notre projet. Toutes les démonstrations ne nécessitant pas impérativement une expérimentation animale seront réalisées *in vitro*. Nous aurons besoin de 270 souris pour que les données soient statistiquement analysables. Dans le respect de la règle des 3R, comme il n'existe pas de possibilités de Remplacement, nous procéderons par étape dans la mise en place de notre modèle de souris vitiligo pour Réduire au mieux le nombre minimal d'animaux afin d'obtenir des analyses comparatives et statistiques suffisantes à la démonstration de l'effet des traitements inhibiteurs utilisés. Afin de respecter la notion de Raffinement, des mesures de surveillance seront réalisées par les intervenants et le personnel de l'animalerie afin de s'assurer que tout au long du projet que les animaux sont en bonne santé, sans comportement anormal ni signe de souffrance. Les animaux seront évalués quotidiennement par le personnel qualifié et compétent qui sera en charge de leur soin et leur hébergement. Tout problème concernant l'état de santé des animaux sera communiqué à l'expérimentateur qui prendra la décision de mettre à mort sur des critères objectifs en cas de souffrance. Les souris seront hébergées à raison de 5 souris / cage dans un environnement propice à leur bien-être (litière en copeaux de peuplier, tunnels en polycarbonate).

15580 L'insuffisance cardiaque, qui se définit comme une incapacité du cœur à pomper suffisamment de sang pour répondre aux besoins de l'organisme, est une maladie fréquente qui touche un million de personnes en France. Ces dernières années, le vieillissement de la population dans les pays industrialisés a conduit à une augmentation significative des cas d'insuffisance cardiaque (IC), la France ne faisant pas exception à la règle puisque la fréquence d'apparition de ce syndrome a doublé en 10 ans. De fait, cette pathologie est devenue une question majeure de santé publique dans un pays où l'espérance de vie continue d'augmenter et ne devrait qu'accroître le nombre de patients insuffisants cardiaque dans le futur. Bien que les décennies passées aient largement contribué à la compréhension de la physiopathologie de l'IC, les traitements actuels ne permettent toujours pas de soigner la dysfonction du myocarde. Ils ne font à ce jour que retarder l'avancée de la pathologie et doivent donc être améliorés pour à terme permettre une guérison complète des patients et éviter le recours à la transplantation cardiaque. Dans ce but, le projet présenté ci-dessous vise à tester les bénéfices apportés par une supplémentation en vitamines B3, B9 et B12 (nicotinamide riboside (NR), folate (Fo) et cobalamine (Cb) dans le cadre d'une thérapie standard de l'insuffisance cardiaque.

Dans cette pathologie, il est bien connu que la dysfonction du myocarde est associée à des perturbations importantes du métabolisme énergétique qui affectent à la fois la production, le

transport et l'utilisation de l'énergie au sein de ce tissu. Le présent travail vise ainsi à caractériser l'impact d'un cocktail de vitamines B (B3, B9 et B12) sur la fonction et le métabolisme énergétique du cœur dans un modèle d'insuffisance cardiaque pour ajouter de nouveaux outils à l'arsenal thérapeutique auquel font appel les services de cardiologie. Malgré les avancées dans le domaine de l'expérimentation animale, l'utilisation d'animaux reste indispensable à l'évaluation de la fonction cardiovasculaire et ne peut malheureusement pas être remplacée par des méthodes alternatives telles que les cultures cellulaires (les cellules cardiaques ne se divisent pas). L'évaluation de la fonction cardiaque sur l'animal entier adulte permet en outre de s'approcher au mieux de la pathologie humaine. Toutes les procédures présentées dans ce projet sont conçues pour respecter le principe des 3R (Réduction, Raffinement, Remplacement) et ont été minutieusement planifiées de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en préservant la validité statistique de l'étude, et en conservant une puissance statistique suffisante pour observer un effet. Les fonctions cardiovasculaires seront étudiées par des méthodes non invasives permettant de limiter le nombre d'animaux et les animaux seront euthanasiés en fin d'expérimentation selon des méthodes reconnues par la législation en vigueur. Dans le but de minimiser le nombre d'animaux intégrés dans l'étude, les tissus prélevés en phase terminale seront partagés et répartis de manière à multiplier les analyses effectuées sur chaque animal. Pour cette étude, une insuffisance cardiaque sera induite chez des souris selon un protocole maîtrisé de longue date au laboratoire qui respecte les procédures de bien-être animal et limite la souffrance par le respect des méthodes anesthésiques et analgésiques. Les animaux seront surveillés quotidiennement et leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer qu'ils ne subissent aucun stress. Afin d'améliorer leurs conditions d'hébergement, leur environnement sera enrichi au moyen de dispositifs dont l'efficacité est désormais largement reconnue. Pour ce projet, un total de 900 souris sera nécessaire.

15581 Les cellules du sang assurant l'oxygénation des tissus et la défense immunitaire se développent dans la moelle osseuse (MO) à partir de cellules souches hématopoïétiques (CSH) tout au long de la vie des individus. L'ensemble des mécanismes biologiques qui gouvernent le maintien du pool de CSH au cours de la vie et la différenciation de ces CSH ne sont pas totalement élucidés. La perturbation de ces mécanismes participe au développement de maladies auto-immunes et de leucémies. Une meilleure compréhension de ceux-ci permettra de développer des cibles et des stratégies thérapeutiques pour l'homme.

Nous utilisons des modèles murins portants des mutations retrouvées dans des pathologies humaines pour comprendre les CSH. Afin d'étudier ces CSH, nous effectuons des transplantations ou greffes de cellules de MO. Cependant pour réaliser ces greffes de MO, les souris sont préalablement conditionnées c'est à dire dépourvues de leurs cellules de MO par irradiation ou par traitement chimique. Nous allons tester ces deux techniques pour pouvoir les utiliser dans nos futures expériences et en remplacement de notre ancien protocole. Les traitements chimiques présentent une alternative à l'irradiation et ne nécessitent pas de matériels spécifiques (source ionisante à rayons X).

Afin de respecter la règle des 3R, un nombre restreint d'animaux va être utilisé. Nous allons tester l'efficacité d'un nouvel irradiateur en utilisant 8 animaux. Si l'efficacité de greffe pour ces animaux est supérieure à 40% pour au moins 6/8 des animaux greffés (75%), nous pourrons utiliser cet appareil. D'autre part 4 groupes de 6 souris seront traitées chimiquement avant la greffe. L'efficacité de greffe de chaque groupe sera évaluée. Le traitement apportant la meilleure efficacité de greffe sera retenu et pourra être utilisé si celui-ci apporte une efficacité de greffe égale ou supérieure à 40% pour au moins 75% des animaux. Au total, nous avons besoin de 32 souris. Pour répondre à l'objectif de raffinement, les souris seront observées quotidiennement durant la prise de greffe (10 premiers jours) puis hebdomadairement. Les souris greffées seront euthanasiées si elles présentent des signes d'anémies (pattes blanches) ou une perte de poids supérieur à 20% par rapport au poids au moment de la greffe. D'autre part l'irradiateur testé est plus puissant que celui précédemment utilisé réduisant ainsi le temps d'irradiation et le stress des souris lorsque celles-ci sont placées dans les boîtes avec compartiments spécifiquement utilisées pour les irradiations. Pour le

remplacement, des études *in vitro* de différenciation de cellules du sang sont effectuées cependant le passage à la souris est nécessaire pour suivre le développement de ces cellules souches dans l'organisme en entier. Par ailleurs ces études ne sont pas possibles sur des organismes moins évolués comme le poisson ou la drosophile possédant un développement des cellules souches sanguines trop différent de celui de l'homme ou la souris.

15582 L'évolution récente du mode de vie dans les pays développés et l'augmentation de l'incidence des maladies chroniques ont fait de la défaillance d'organe vital la principale cause de décès prématuré dans le monde.

La meilleure option thérapeutique chez les patients au stade terminal d'une défaillance d'organe vital est la transplantation, consistant à substituer chirurgicalement l'organe défectueux par un greffon fonctionnel prélevé chez un donneur génétiquement différent de la même espèce. La principale complication et cause d'échec en transplantation est le phénomène de « rejet ». Le système immunitaire du receveur reconnaît des antigènes présents à la surface du greffon comme étrangers ou non « soi ». Il va alors initier un processus de défense en sécrétant des anticorps qui vont attaquer et endommager irrémédiablement l'organe greffé. Ce phénomène est nommée rejet humorale ou rejet médié par la production d'anticorps. Les cellules immunitaires supports de ce rejet sont les lymphocytes B mémoires et les cellules sécrétrices d'anticorps. Les lymphocytes B reconnaissent spécifiquement tout agent étranger n'appartenant pas au « soi » et se différencient en cellules sécrétrices d'anticorps appelées plasmocytes. C'est pourquoi les personnes transplantées sont contraintes de prendre à vie des traitements immunosuppresseurs afin d'éliminer ces populations immunitaires et de prévenir/limiter le rejet.

Cependant, les combinaisons immunosuppressives disponibles n'ont montré qu'une efficacité relative et ne parviennent au mieux qu'à réduire transitoirement le titre en anticorps anti-greffon. Il a récemment été montré que l'échec des thérapies éliminant les plasmocytes serait dû à la prolifération rapide des lymphocytes B mémoires. Ces derniers se différencieraient en plasmocytes producteurs d'anticorps anti-greffon.

Il apparaît primordial d'étudier et expliciter les mécanismes immunologiques impliqués dans le remplacement des plasmocytes par les lymphocytes B mémoires, pour générer de nouvelles connaissances fondamentales sur le mémoire immunitaire mais aussi, proposer des solutions pour endiguer l'échappement du système immunitaire aux thérapeutiques actuelles contre le rejet.

Ce projet nécessite l'emploi de modèles animaux et l'injection de molécules immunogènes, communément utilisées en vaccination chez la souris, afin de mimer les réactions du système immunitaire induites chez le patient greffé. Cette approche nous permettra d'appréhender la complexité des mécanismes immunologiques sollicités, de moduler la population plasmocytaire et étudier le devenir des cellules immunitaires d'intérêts, qui ne peuvent être modélisés par des modèles in-vitro seuls.

A visée de raffinement, les prélèvements sanguins et injections seront réalisés sous anesthésie afin de limiter toute souffrance chez les animaux de même que tout stress induit par le geste.

Ce projet implique le recours à 372 souris au maximum. A visée de réduction, ce nombre a été calculé par des méthodes bio-statistiques et correspond au nombre de souris nécessaire pour répondre à la problématique posée. Par soucis de réduction toujours, des outils en expérimentation biologique (technique de marquage fluorescent des cellules d'intérêts) déjà mis au point pour la suivie et l'isolation des lymphocytes B et des plasmocytes, seront utilisés. Cela nous permettra de limiter au maximum les expériences de mise au point et donc le nombre d'animaux nécessaires à la réalisation du projet.

15583 Les Enniatines sont des mycotoxines et appartiennent à la classe la plus courante de contaminants des céréales. L'Enniatine-B est la molécule la plus couramment retrouvée lors de contaminations parmi les 28 homologues identifiés dans cette famille de molécules et par conséquent nos concitoyens peuvent être exposés à de faibles doses dans leur alimentation quotidienne. Du fait qu'il

s'agit d'une toxine, il est éthiquement délicat d'étudier sa toxicologie et notamment son devenir directement chez l'humain.

Ainsi ce projet de recherche se propose d'utiliser des méthodes alternatives permettant de palier à ce manque de données chez l'humain. Ces alternatives reposent sur 3 étapes : a) la génération *in vitro* (à partir d'essais de laboratoires sur cellules uniquement) de données de métabolisme et de fixation aux protéines pour l'Enniatine-B puis b) à l'aide de modèles mathématiques d'extrapolation permettant de prendre en compte le changement d'échelle de la cellule à l'organe et enfin c) par une autre modélisation dite pharmacocinétique permettant d'intégrer ces données cellulaires au fonctionnement de l'organisme (animal ou humain) entier.

Les essais (*in vitro*) ont déjà été réalisés (dans le cadre de ce projet) avec des cellules de souris, de rats et d'humains pour déterminer les différences inter-espèces. Afin de valider les extrapolations de la cellule à l'animal faites à l'aide de logiciels, il est nécessaire de réaliser des expérimentations animales.

La validation de ce modèle permettra par la suite de réaliser d'autres prédictions chez la souris et le rat sans recours à des expérimentations animales supplémentaires. Cela nous autorisera à faire des prédictions également chez l'humain. Comme cela vient d'être précisé, cette validation passe par l'étude du devenir de l'Enniatine-B chez la souris et le rat. Ainsi lors des procédures d'expérimentation animale de ce projet, il nous faut donc administrer à chaque rongeur par voie orale une dose unique d'Enniatine-B puis leur faire des prélèvements réguliers de sang sur une journée afin de pouvoir suivre l'évolution de ses concentrations dans le plasma.

Dans un effort de réduction, le nombre d'animaux est calculé de manière à obtenir la quantité de prélèvement sanguin suffisant. Nous utiliserons 18 animaux au total; à savoir respectivement 6 rats et 12 souris. Les procédures expérimentales sont conçues pour limiter autant que possible la souffrance animale, en minimisant les interventions sur les animaux. Les animaux seront hébergés sur litières dans des boîtes en polypropylène, en respectant les normes du bien-être animal et avec, à disposition, des enrichissements appropriés (hamac, igloo, jouets...). Concernant le raffinement, des points limites ont été définies afin de permettre une intervention rapide sur les animaux. La douleur, le stress ou les contraintes seront atténués par des méthodes ou médications appropriées.

15584 L'arthrose, maladie dégénérative articulaire la plus répandue, est caractérisée par une érosion du cartilage, la formation d'ostéophytes, une sclérose osseuse sous-chondrale et une inflammation synoviale. L'arthrose est également couramment décrite comme la conséquence d'une perturbation de l'homéostasie des tissus cartilagineux. En condition physiologique normale, l'homéostasie du cartilage dépend principalement du maintien de l'autophagie par les chondrocytes. Avec l'âge, cette activité autophagique diminue progressivement dans les chondrocytes poussant les cellules vers un phénotype sénescence. Il a récemment été suggéré que le rétablissement du processus d'autophagie et la suppression des cellules sénescence protégerait de la progression de l'arthrose. Le vieillissement étant l'un des principaux facteurs de risque de l'arthrose, nous proposons de tester des facteurs anti-âge pour le traitement de cette maladie. Parmi les facteurs anti-géroniques, la protéine alpha-klotho (a-KL) semble être l'un des plus pertinents. Les souris hypomorphes pour a-KL présentent un vieillissement prématuré, plusieurs polymorphismes du gène a-KL sont associés à un risque accru d'arthrose et des niveaux différents d'ARNm d'a-KL ont été rapportés entre le cartilage articulaire sain et arthrosique. De même, des publications récentes ont établi de manière intéressante des relations entre a-KL et les processus de sénescence et d'autophagie. Par ailleurs, des diminutions d'a-KL semblent impliquées dans plusieurs autres maladies liées à l'âge. Lors de premières expérimentations nous avons montré qu'a-KL diminue avec l'âge dans le cartilage articulaire alors que l'arthrose apparaît. Cependant, le rôle d'a-KL dans la physiopathologie du cartilage articulaire reste inconnu. Dans ce contexte, l'objectif global de ce projet est d'explorer le rôle de la protéine anti-géronique a-KL dans le cartilage articulaire. Pour cela, nous avons généré une souche de souris inductible pour la délétion d'a-KL spécifiquement dans le cartilage articulaire (ACAN-KL). Ces souris vont nous permettre d'analyser l'impact de la délétion de la protéine a-KL sur le vieillissement du cartilage articulaire. La Procédure n°1 a pour but de déterminer l'impact de la délétion d'a-KL dans le cartilage sur le vieillissement articulaire et l'apparition de l'arthrose liée à

l'âge. Pour cela, a-KL sera délété par injection de tamoxifène chez des souris ACAN-KL jeunes (3 mois), des souris d'âge moyen (6 mois) et des souris vieilles (12 mois). L'impact de la délétion d'a-KL sur le vieillissement articulaire sera évalué 1 mois, 3 mois et 6 mois après injection de tamoxifène. Pour cela, les souris issues de la procédure 1 subiront une ponction intracardiaque terminale décrite dans la procédure n°2 et seront sacrifiées. Les pattes, le rachis, la tête et le rein seront prélevés pour évaluer le niveau d'arthrose par des analyses moléculaires, radiologiques, histologiques et immunohistochimiques et pour l'analyse des niveaux d'a-KL.

Ce projet prend en compte la règle des 3R en appliquant les consignes suivantes

- Je réduis le nombre d'animaux en utilisant le nombre minimal requis pour chaque type de test afin d'atteindre une significativité statistique. La procédure n°1 utilisera un total de 990 souris réparties en groupe de 15 souris par sexe (mâle et femelle), par âge d'induction (3, 6 et 12 mois) et temps d'analyse post délétion (1, 3 et 6 mois) et par phénotype étudié (sauvage (WT), ACAN-KL hétérozygote (HE) et ACAN-KL homozygotes (HO) auxquelles s'ajoutent deux groupes contrôles de 5 souris par sexe (mâle et femelle), par âge d'induction (3, 6 et 12 mois) par temps d'analyse (1, 3 et 6 mois) permettant de vérifier l'effet du tamoxifène seul et l'effet de l'expression de la recombinase Cre. Cette saisine nécessitera donc un total de 990 souris. La procédure n°2 concerne également les souris de la procédure n°1 et n'utilisera pas d'animaux supplémentaires. Ainsi, le nombre d'animaux total pour cette saisine s'élève à 990.

- Je raffine en réduisant la douleur lors des expérimentations afin d'améliorer la reproductibilité et la qualité de l'expérimentation. Les souris seront hébergées en groupe sociaux à raison de 5 souris par cage avec de l'enrichissement. Les souris seront observées 1 fois par semaine jusqu'à la fin de l'expérimentation. Par ailleurs, des points limites ont été identifiés et les procédures de raffinement à mettre en place lors de l'atteinte de ces points limites ont été décrites.

- Malheureusement, je ne peux pas remplacer cette expérimentation animale par un modèle *in vitro*, car cette étude vise à déterminer l'impact de l'inactivation d'un gène sur l'apparition de l'arthrose liée à l'âge.

15585 Des résultats obtenus au sein de notre laboratoire ont démontré le rôle crucial de la flore intestinale dans l'efficacité de traitements anti-cancéreux. Or chez les patients atteints d'un cancer, de nombreux facteurs entraînent un déséquilibre de la flore intestinale (dysbiose) pouvant être impliqué dans la résistance à ces traitements. Pour étudier les dysbioses de patients chez la souris, nous collectons les selles de patients atteints de cancer afin de réaliser des transplantations fécales chez la souris, qui possèdera alors les bactéries de la flore intestinale des patients. Les souris seront également implantées avec différentes tumeurs puis un traitement anti-cancéreux sera mis en place.

L'objectif de cette étude est de trouver un moyen d'améliorer l'efficacité du traitement anti-cancéreux chez la souris en agissant sur la flore intestinale du patient qui a été transféré chez la souris.

Pour modifier la flore intestinale, nous testerons une supplémentation des souris avec des composants de l'alimentation qui favorise la croissance de bactéries intestinales bénéfiques à notre santé on appelle ces composants des prébiotiques. Dans cette étude, les pré-biotiques testés seront des sucres appelés glycanes. Nous testerons également une supplémentation en bactéries définies comme bénéfique pour la santé on parle alors de probiotique.

De plus, nous déterminerons si ces supplémentations en prébiotiques ou probiotiques induisent des effets bénéfiques ou néfastes sur le métabolisme de la souris ou sur le système immunitaire.

Nous avons choisi les glycanes comme prébiotiques car des études cliniques sur des volontaires sains ont mis en évidence un changement de la composition de la flore intestinale suite à l'ingestion de glycanes.

Nous avons choisi d'utiliser certaines bactéries comme probiotiques car ces bactéries permettent la réinduction d'une réponse immunitaire anti-tumorale qui se trouve supprimée par les cellules

cancéreuses. Ainsi, ces bactéries réduisent la croissance tumorale et amplifient l'effet de traitements anti-cancéreux connus pour activer le système immunitaire (immunothérapies).

Par ailleurs, étant donné le nombre élevé d'animaux prévus, il semble important de mentionner dans le RNT que le projet est prévu pour une durée de 3 ans, mais aussi qu'une pré-sélection des prébiotiques à tester est, au préalable, réalisée dans des expériences de cultures de cellules permettant de réduire le nombre d'animaux nécessaires.

Ce projet nécessite des procédures expérimentales utilisant des animaux vivants et plus particulièrement la souris. Pour la réalisation de ce projet, l'utilisation d'animaux vivants est indispensable car seul un animal vivant, entier, peut permettre d'étudier dans leur globalité, la flore intestinale, le système immunitaire anti-tumorale et l'effet des traitements anti-cancéreux dans un contexte tumoral, avec toutes les interactions nécessaires, impossibles à reproduire en culture de cellules. Le projet est prévu pour une durée de 3 ans et nécessitera 2808 souris. Ce nombre important d'animaux se justifie par les différentes combinaisons de traitements anti-cancéreux, les différentes supplémentations en prébiotiques et probiotiques et les différents types de tumeurs implantées.

Les procédures expérimentales mises en jeu respecteront les exigences de remplacement, réduction et raffinement. En effet, une pré-sélection des prébiotiques à tester est, au préalable, réalisée dans des expériences de cultures de cellules permettant de réduire le nombre d'animaux nécessaires. De plus, les groupes seront constitués d'un minimum d'animaux assurant la fiabilité des résultats en termes de statistiques. Le nombre de prélèvements pré- et post-mortem seront optimisés afin d'étudier le plus de paramètres possibles et ainsi d'éviter la répétition d'expérimentation. Enfin, les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux, en ayant recours à l'anesthésie locale ou générale dépendant des gestes techniques.

La contrainte principale pour les animaux sera l'implantation de tumeurs. Ces contraintes seront limitées par un suivi très strict avec application de points limites, limitation des tailles de tumeurs par mesure physique (sous-cutanée) ou au moyen d'imagerie optique de luminescence des animaux (qui permet aussi un suivi longitudinal non invasif plus raffiné).

15586 La peste porcine africaine (PPA) est une maladie virale contagieuse, classée danger sanitaire de 1^{ère} catégorie en France. Elle affecte tous les porcins. Elle induit une forte mortalité chez les porcs domestiques et chez les sangliers alors qu'elle est asymptomatique chez leurs cousins sauvages africains (phacochères et potamochères). Elle sévit historiquement en Afrique sub-saharienne. Depuis son introduction en 2007 en Géorgie et Arménie, elle a conquis le continent européen via la fédération de Russie et la Biélorussie. En 2014, la PPA s'est invitée au sein de l'Union européenne, en Pologne et dans les pays Baltes où elle est devenue endémique chez les sangliers sauvages. A la faveur d'erreurs humaines, l'infection s'est étendue en Moldavie (2016), Roumanie (2017), République Tchèque (2017), Hongrie (2018), Belgique (Septembre 2018), Slovaquie (2019), Serbie (2019) et plus récemment en Grèce (2020). La PPA a depuis son introduction en Chine en 2018 envahi l'Asie (Mongolie, Vietnam, Taiwan, Corée du Nord, Cambodge, Birmanie, Philippines, Indonésie, Timor-Oriental en 2019; Papouasie-Nouvelle Guinée en 2020).

En absence de vaccin, actuellement le seul moyen de contrôle en élevage est le renforcement des mesures de biosécurité, et l'installation de clôtures pour protéger les élevages plein-air, ainsi que l'abattage de tous les porcs des élevages infectés, pour éviter la diffusion de la maladie. De même, le seul moyen de contrôle pour enrayer l'avancée de la PPA dans les populations de sangliers sauvages est le cloisonnement des corridors verts par l'installation de kilomètres de clôtures et une diminution drastique de la densité des sangliers. Le développement de vaccins sûrs et efficaces ciblant les porcs domestiques comme les sangliers sauvages représente ainsi un des enjeux de la lutte contre la PPA en Europe comme dans tous les pays producteurs de porcs. Actuellement, les pistes vaccinales les plus prometteuses sont basées sur des souches virales atténuées dont le risque de retour à la virulence complique le développement et la commercialisation.

Une nouvelle approche est envisagée en utilisant comme vaccin une fraction du virus. Il s'agit d'isoler des vésicules extracellulaires ne renfermant pas le génome du virus et qui se forment lors de la sortie des virus des cellules où ils se répliquent. Ces vésicules ont la particularité de mimer le virus. Elles vont être reconnues par le système immunitaire qui va pouvoir ainsi développer une réponse spécifique contre le virus de la PPA sans pour cela rendre les animaux malades. Une première étude a démontré qu'il était possible d'isoler des vésicules virales ne contenant pas de génome, donc incapables de se répliquer, à partir du sérum de porcs inoculés 24 jours plus tôt avec une souche virale naturellement atténuée.

L'objectif principal de ce projet est d'évaluer *in vivo* la capacité de porcs, immunisés avec ces vésicules, à résister à une inoculation avec une souche sauvage virulente. L'identification des protéines virales des vésicules fournira des données essentielles sur leurs propriétés et leur pouvoir protecteur. Ce projet se décline en deux procédures, nécessitant au total 17 porcs.

Ces procédures expérimentales seront menées dans le respect de la règle des 3R. Tout d'abord, l'estimation du nombre de porcs nécessaires se fonde sur les activités menées dans notre laboratoire sur la thématique de la Peste porcine africaine au cours des vingt dernières années. En se basant sur les données cliniques et biologiques recueillies lors d'expérimentations précédentes ayant permis de mettre au point un modèle d'immunisation de porcs avec une souche atténuée et une épreuve virulente, un maximum de 17 porcs est nécessaire sur la durée de ce projet.

Aucune méthode alternative n'existe actuellement pour évaluer l'efficacité vaccinale d'un tel procédé innovant, que l'espèce animale cible, le porc. Pour le raffinement, les animaux auront accès à de l'eau et à de la nourriture à volonté. Le milieu sera enrichi par des objets manipulables. La présence de lampes chauffantes et de plaques de couchage leur apportera des éléments de confort. Un soin particulier sera apporté au suivi clinique de chaque animal. Des observations basées sur des atteintes de points limites (réactivité des animaux à des stimuli, hyper- et hypothermie, perte d'appétit et/ou perte de poids sévère) ou l'apparition de douleurs ou de blessures sont prévues pour limiter la souffrance éventuelle des animaux.

Ce travail, outre une meilleure compréhension des mécanismes de protection liés à l'inoculation de vésicules, permettra d'identifier des pistes de développement rationnel d'un vaccin contre la peste porcine africaine.

15587 L'hypophyse est une glande située à la base du cerveau. Elle contrôle les sécrétions hormonales du corps humain (hormones de croissance, hormones thyroïdiennes, hormones sexuelles...).

Au sein de cette glande, des tumeurs peuvent se développer. Il s'agit de tumeurs ayant pour répercussions, soit un envahissement des structures proches de l'hypophyse, soit un dérèglement des productions hormonales, soit les deux.

Actuellement, le meilleur traitement contre ces tumeurs hypophysaires consiste à les retirer chirurgicalement. La chirurgie est souvent mise en échec lorsque les tumeurs envahissent les structures cérébrales adjacentes dont l'accès n'est pas possible pour le chirurgien.

Les traitements médicamenteux alternatifs sont coûteux pour une efficacité variable.

Les mécanismes à l'origine de la survenue d'une tumeur au sein de l'hypophyse et ceux à l'origine de sa propagation vers les structures cérébrales adjacentes ne sont pas compris. L'objectif de notre projet est de comprendre les mécanismes de la tumorigenèse et de l'envahissement des structures cérébrales adjacentes pour mettre au point de nouveaux traitements.

L'utilisation de modèles animaux dans l'étude des mécanismes de dissémination tumorale est nécessaire pour reproduire au mieux le micro-environnement tumoral humain. Il n'existe à ce jour aucune méthode alternative ou substitutive qui permette un remplacement *in vitro* ou *in silico*, et l'étude de nouvelles stratégies thérapeutiques doit nécessairement être faite *in vivo*. Nous avons néanmoins optimisé les protocoles afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Nous limiterons nos expériences à l'étude des mécanismes ayant déjà montré leur efficacité sur des lignées cellulaires. Des tests de puissance statistique ont été utilisés pour calculer le plus petit nombre d'animaux nécessaire à l'obtention de résultats statistiquement exploitables.

Enfin, dans un souci de raffinement des procédures, un soin particulier sera apporté aux questions relatives au bien-être animal, les conditions d'élevage et d'hébergements seront appropriées, les animaux seront maintenus en cages collectives avec utilisation d'un enrichissement du milieu. Finalement nous utiliserons des analgésiques avant et après tout acte chirurgical.

La physiologie générale chez le rongeur est suffisamment proche de celle de l'être humain pour que les informations obtenues soient pertinentes d'un point de vue médical. Nous utiliserons au total un maximum de 123 animaux (souris, rats) sur 3 ans.

15588 L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une maladie cardiopulmonaire incurable. Dans la majorité des cas, la maladie est progressive et se définit par une élévation de la pression sanguine au niveau des artères pulmonaires, évoluant vers une défaillance cardiaque droite puis au décès du patient. Outre la transplantation pulmonaire, dont les résultats restent insatisfaisants, il n'existe actuellement aucun traitement curatif. L'HTAP se manifeste par des signes apparemment bénins, comme l'essoufflement à l'effort, responsables d'un diagnostic tardif et d'un pronostic grave en l'absence de traitement, l'espérance de vie n'atteint en moyenne que 2,8 ans après diagnostic. Bien que les mécanismes physiopathologiques restent encore à découvrir, il est connu que des anomalies touchant les fonctions de toutes les cellules de la paroi vasculaire des petits vaisseaux pulmonaires (cellules endothéliales, musculaires lisses, mésenchymateuses et péricytes), ainsi que des cellules circulantes immunitaires et de l'inflammation, vont être responsables de la réduction progressive de la lumière vasculaire, empêchant ainsi le bon écoulement sanguin et favorisant le développement et la progression de la maladie. Ce phénomène, dont les mécanismes cellulaires sous-jacents ne sont toujours pas complètement élucidés, est appelé remodelage vasculaire pulmonaire.

Nos données d'études *in vitro* montrent la présence d'altérations des protéines responsables du recyclage des récepteurs cytokiniques de type I (TypeIR) dans les cellules provenant de patients atteints d'HTAP, ce qui pourrait représenter une nouvelle cible thérapeutique. Bien que notre laboratoire travaille sur des cultures cellulaires provenant de patients atteints de cette maladie, seule l'expérimentation animale permet de retrouver l'ensemble de ces acteurs au sein d'un même modèle, dans un environnement physiologique et pathologique. Les modèles animaux d'HTAP sont alors des outils très importants et permettent le suivi de la mise en place dans le temps des différents mécanismes physiopathologiques et d'avoir donc accès aux phases précoces de la maladie. Les modèles animaux, régulièrement utilisés dans de nombreuses publications de différentes équipes de recherche, sont un réel apport et un outil indispensable pour nos travaux de recherche.

Nous souhaitons évaluer la contribution de la dérégulation des TypeIR au remodelage vasculaire pulmonaire dans le modèle HYPOXIE CHRONIQUE, puis traiter l'HTAP induite à l'aide de modulateurs spécifiques des protéines responsables du recyclage des TypeIR. Ce modèle fait intervenir des modifications fonctionnelles, structurelles et moléculaires du lit vasculaire pulmonaire et du ventricule droit. Les contraintes observées chez l'animal ne seront pas plus sévères que les signes bénins retrouvés chez l'homme puisque l'étude se réalise dans les phases précoces de l'HTAP. Nous évaluerons plusieurs doses pour les modulateurs spécifiques, seules et combinées avec les traitements palliatifs utilisés chez le patient. Afin de réduire au minimum le nombre de souris utilisées, un calcul de l'effectif optimal tenant compte de la puissance et de la dispersion des données (Power 90% Significance 0.05, Delta/Ecart type = 1,3) a été effectué et prévoit l'utilisation de 364 souris pour le projet sur une durée de 5 ans. Durant les expérimentations, les animaux seront quotidiennement observés et évalués au moyen d'un score (apparence, poids et comportement) pour s'assurer de leur bien-être.

15589 La maladie rénale chronique (MRC) est un problème de santé publique majeur qui touche environ 10 % de la population générale. Les maladies cardiovasculaires (CV) sont la première cause de morbi-mortalité au cours de la MRC. Pour exemple, le risque de survenue d'un événement CV grave chez un patient dialysé âgé de 25 ans est le même que celui d'un sujet de 80 ans, non insuffisant rénal dans la population générale. Malgré cela, les essais interventionnels visant à corriger les facteurs de risque CV classiques se sont majoritairement soldés par des échecs. Cette observation

souligne l'importance de comprendre les mécanismes responsables de l'atteinte vasculaire chez ces patients afin de développer des approches thérapeutiques novatrices.

Les mécanismes impliqués dans l'atteinte artérielle associée à la MRC sont mal connus. Au cours de la MRC, les patients sont exposés aux facteurs de risques cardiovasculaires traditionnels comme le diabète, la dyslipidémie, le surpoids, l'hypertension artérielle, le tabagisme mais également à des facteurs de risques liés à l'urémie incluant, entre autres, les modifications biochimiques des protéines telles que la carbamylation, le stress oxydatif (impliquant notamment la fonction mitochondriale) et l'inflammation.

L'objectif de ce projet est précisément de déterminer l'effet des toxines urémiques, plus précisément de l'inflammation, la dysfonction mitochondriale et la carbamylation des protéines sur la fonction et le remodelage des artères de gros et de petit calibre.

L'étude vasculaire sera réalisée chez des souris mâles. En effet, il existe un effet protecteur des œstrogènes ainsi qu'un impact du cycle sur la fonction vasculaire qui risquent d'induire un biais. L'expérimentation débutera chez des souris âgées de 12 semaines environ.

L'étude sera réalisée avec

Modèle A : souris 129/Sv avec étude de 3 groupes 1 groupe ayant eu une ablation subtotale des reins (CKD), 1 groupe témoin (SHAM) et 1 groupe contrôle (CTRL) réparti en 2 mots 1 lot traité au cyanate de sodium dans l'eau de boisson (CYA) et 1 lot traité au chlorure de sodium 1% (NaCl)

Soit 120 souris

Modèle B souris 129/Sv avec étude de 2 groupes 1 groupe contrôle (CTRL/SHAM) et 1 groupe ayant eu une ablation subtotale d'un rein (CKD). Chaque groupe étant réparti en 4 lots car 3 molécules pharmacologiques ciblant les voies de l'immunité innée seront testées traitement avec les molécules pharmacologiques par la voie sous cutanée ou bien per os volontaire une fois par jour et 1 lot sans traitement soit 240 souris

En accord avec la règle des 3 R, et dans le but d'obtenir des résultats significatifs, nous utiliserons le moins de souris possible.

Nous appliquons la règle des 3R

Nous ne pouvons pas remplacer ce modèle par un modèle *in vitro*, car le remodelage vasculaire met en jeu le système immunitaire et hormonal.

Nous réduisons au minimum le nombre d'animaux pour obtenir des résultats exploitables au niveau statistique. Une analyse statistique des résultats sera réalisée (analyse de variance ANOVA).

Un minimum de 12 animaux (nombre minimum pour aboutir au seuil de significativité en réactivité vasculaire s'il devait y avoir des différences) par groupe qui sera constitué au départ de 20 animaux afin de tenir compte d'une mortalité éventuelle. La douleur de l'animal est évaluée au réveil, puis quotidiennement jusqu'au sacrifice,

Les instruments sont préalablement stérilisés par stérilisateur à billes à chaud. Les animaux seront anesthésiés sous isoflurane 5% puis maintien à 2% et maintenus à 37°C par un tapis chauffant. Lors des différentes interventions, un champ opératoire sera utilisé. Une injection de buprénorphine 1 mg/kg sera effectuée en sous-cutané. Les modifications de rythme cardiaque et respiratoire seront observées. La réponse nociceptive des animaux sera testée en cours d'intervention (pincement de la patte arrière). Les animaux seront mis dans une cage propre et dans une couveuse jusqu'au réveil. au niveau de la respiration, du poids ou une anomalie dans la coloration des muqueuses sont présents, les animaux seront exclus du protocole avant la chirurgie.

La surveillance des animaux, en concertation avec la SBEA, sera réalisée de façon continue jusqu'au réveil.

Les animaux seront surveillés toutes les heures pendant les 4 premières heures puis quotidiennement.

Nous raffinons nos conditions d'expérimentation et d'hébergement pour le bien-être de nos animaux. Ils sont hébergés dans des cages aux normes (au minimum par 2 et au maximum par 4)

suivant l'âge et le poids des animaux, de plus les cages sont enrichies par des jouets (rouleau sopalin, copeaux).

Les animaux sont surveillés au quotidien par le personnel de l'animalerie et le poids est suivi 2 fois par semaine. Nos conditions d'expérimentation et d'hébergement pour le bien-être de nos animaux avec le soutien de la structure de bien-être animal (SBEA). Les animaux sont hébergés dans des cages aux normes suivant l'âge et le poids des animaux et les cages sont enrichies par des jouets (copeaux, cabanes, sopalin). Nous raffinons nos expérimentations en utilisant les animaux de chaque groupe pour recueillir plusieurs types de données. Sur chaque animal l'ensemble des organes et tissus pouvant être recueillis sont prélevés afin d'anticiper les expérimentations futures.

Au total de 360 souris males seront donc nécessaires à la réalisation de cette étude.

Les retombées attendues suite à la réalisation de ce projet sont de deux types

1 Fondamentales ces recherches devraient permettre d'identifier de nouveaux mécanismes d'atteinte vasculaire au cours de la maladie rénale chronique et de caractériser les voies physiopathologiques impliquées dans le remodelage vasculaire

2 Thérapeutiques ces travaux permettront d'identifier de nouvelles molécules d'intérêt pour l'atteinte vasculaire liée la maladie rénale chronique.

15590 Les anticorps sont des protéines produites par le système immunitaire pour assurer la sécurité de l'organisme et lutter contre les infections. Malheureusement, dans certaines situations, la production par le système immunitaire d'anticorps anormaux qui attaquent des protéines présentes à la surface des neurones entraînent des maladies neurologiques et psychiatriques graves. L'expression aberrante d'anticorps s'attaquant aux récepteurs NMDA du glutamate est par exemple la cause d'une forme très sévère encéphalite (inflammation du cerveau). Ces anticorps provoquent de l'épilepsie, des maladies mentales, et de l'autisme chez l'enfant. Ils peuvent entraîner des séquelles irréversibles. La prise en charge actuelle de cette maladie repose sur l'administration d'immunosuppresseurs et d'antiépileptiques qui restent malheureusement peu efficaces. L'administration de kétamine, un anesthésique qui bloque ces mêmes récepteurs, pourrait représenter un traitement prometteur de cette maladie grâce à son activité antiépileptique et ses effets contre l'anticorps lui-même. Malheureusement, les mécanismes d'action de la kétamine et son efficacité dans le traitement des encéphalites sont encore mal connus. L'objectif de ce travail est d'étudier à différents stades du développement neurologique, l'effet protecteur potentiel de la kétamine sur les convulsions et les troubles du comportement causés par les auto-anticorps. Pour mimer la maladie, nous allons exposer le cerveau de rats à des anticorps de patients à trois stades différents du développement cérébral : au 12ème jour de gestation pendant le développement embryonnaire (correspondant au 2ème trimestre de grossesse chez l'Homme), au 12ème jour post-natal pendant la période critique du développement cérébral, et à l'âge adulte après le 60ème jour post-natal. L'administration de kétamine en parallèle permettra de tester son effet protecteur potentiel. Nous analyserons pour cela l'impact des anticorps et les bénéfices escomptés de l'administration conjointe de kétamine sur le comportement et la survenue de convulsions chez les animaux traités. Les approches comportementales de ce projet pour mesurer les séquelles nécessitent d'utiliser des animaux. Les autres méthodes alternatives (« *in vitro* », modélisation) développées actuellement ne permettent pas de reproduire la complexité du cerveau et du comportement de l'animal (remplacement). Cependant, la règle des 3R a été mise en place dans la conception de notre projet et une planification précise des expériences a été établie afin de réduire au maximum le nombre d'animaux inclus dans cette étude, tout en ayant des groupes suffisamment importants pour obtenir des statistiques solides. Nous proposons ainsi un projet portant sur 480 rats (réduction), avec un nombre de 12 animaux par groupe déterminé comme nécessaire pour l'analyse des tests comportementaux et des approches biochimiques sur les cerveaux prélevés post mortem chez les animaux traités et témoins. Une attention permanente sera portée au bien-être des animaux avant et tout au long des protocoles (raffinement), notamment en assurant un enrichissement adéquate de leur milieu : papier tressé pour les mères, tunnels en carton dans des cages d'hébergement conçues pour qu'ils puissent exprimer leur comportement naturel. Ils seront surveillés quotidiennement par des personnels compétents et formés. Les douleurs consécutives à

la chirurgie seront soulagées à l'aide des molécules les plus adaptées au protocole et à l'état des animaux. Aucune des données recueillies sur les molécules à visée thérapeutique injectées par voie intrapéritonéale ne prédisent que ces injections seront douloureuses. Néanmoins, l'état des animaux sera particulièrement surveillé durant le temps de ces injections et des mesures adaptées seront prises dans la cas contraire. Les tests comportementaux utilisés dans ce projet ne provoquent pas de douleurs et sont peu contraignants pour les animaux. Des points limites suffisamment prédictifs sont définis pour limiter la souffrance tout au long de la vie de l'animal. En cas de souffrance ou de détresse persistante, les animaux seront mis à mort dans des conditions qui évitent souffrance et stress.

15591 Le cerveau est constitué de neurones et d'autres types de cellules, les cellules gliales, parmi les quelle il y a les astrocytes. Les astrocytes ont longtemps été considérées comme des cellules de support métabolique pour les neurones. Néanmoins, un nombre croissant d'études montrent que ces cellules jouent un rôle actif dans la régulation de l'activité neuronale via plusieurs mécanismes, comme la formation et la maturation des synapses, la modulation de la transmission des signaux entre les neurones et la régulation de l'environnement cérébral. De plus, des études récentes ont montré que les astrocytes peuvent réguler l'activité et la survie neuronale en échangeant des constituants cellulaires. Ce mécanisme a été démontré être présent en conditions pathologiques chez la souris, mais son rôle et impact n'a pas encore été étudié en conditions physiologique et dans une autre condition pathologique comme l'épilepsie. Le but de ce projet est donc d'étudier la présence et l'impact du transfert de mitochondries entre les astrocytes et les neurones dans le cerveau normal et épileptique chez la souris. Ce nous permettra une meilleure compréhension du rôle de ce phénomène dans le fonctionnement du système nerveux central et pourrait identifier des nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement de l'épilepsie.

Pour accéder à l'activité et aux interactions des astrocytes et des neurones et pour étudier le transfert de mitochondries, nous travaillerons chez la souris et nous utiliserons trois approches différents 1/ prélèvement de tissus et analyse immunoistochimique des molécules d'intérêts suite à l'injection intraoculaire ou intracérébrale de molécules rapporteuses, 2/ évaluation par enregistrements électrophysiologiques *in vitro* des interactions entre neurones et astrocytes (field recording, patch-clamp, imagerie calcique et matrices de micro-électrodes) et 3/ analyse de l'activité *in vivo* dans un modèle d'épilepsie chronique induite par injection intracérébrale d'une substance pro convulsant. Ce projet nécessite des expériences chez l'animal car nous nous intéressons aux interactions entre les neurones et les astrocytes en conditions physiologiques et pathologiques, telles que l'épilepsie, où l'activité des réseaux neuronaux intègres et connectés est fondamentale. Ces conditions ne peuvent pas être remplacées par des modélisations informatiques ou *in vitro* avec des cellules en culture.

Ce projet de recherche fondamentale se déroulera sur 5 ans et nécessitera de 1095 souris. Ce nombre a été rationalisé à partir de statistiques de puissance.

Nous tendrons vers les objectifs préconisés de réduction du nombre d'animaux utilisé et du raffinement de la méthodologie utilisée de la manière suivante (1) Le nombre d'animaux utilisés sera minimisé autant que possible grâce à l'étude de plusieurs paramètres chez le même animal (pour les souris épileptiques, les enregistrements *in vivo* seront suivis par les expériences *in vitro* d'électrophysiologie et imagerie chez le même animal). (2) Nous réduirons au minimum les techniques douloureuses ou stressantes. Les procédures décrites ci-dessus ont une durée courte ou moyenne (entre 10 et 45 minutes) et seront effectuées sous anesthésie à l'aide d'Isoflurane (Procédures 4 à 6), ou sous Euthasol, un euthanasiant (Procédure 2). Dans le cas de procédures expérimentales invasives avec réveil (procédures 4 à 6), les souris supportent en effet très bien l'Isoflurane et récupèrent rapidement de la chirurgie par la suite. Ceci est essentiel car cela permettra d'optimiser le nombre d'animaux opérés en réduisant au mieux le risque de mauvaise tolérance des procédures. Pour la procédure visant à produire des souris épileptiques et qui nécessite de 3 étapes, nous avons optimisé la méthode pour réduire le nombre de manipulation de l'animal. De plus, nous utiliserons de l'analgésie (buprénorphine) avant chaque procédure chirurgicale de façon adaptée au poids de l'animal. Les animaux seront logés dans un

environnement enrichi avec boisson et nourriture ad libitum et en cages collectives (2 à 5 souris par cage en fonction de la procédure). Chaque animal sera suivi tout au long de l'expérience, en particulier après les procédures chirurgicales, afin de détecter tout indicateur de souffrance et y pallier (désinfection de la zone opérée, application d'un anesthésique local, cages capitonnées avec tissu adapté).

15592 L'hypogonadisme hypogonadotrope est une maladie qui touche 1 individu sur 5000. Les hommes qui en sont atteints ont des taux circulants d'hormones LH et FSH très bas. La conséquence directe de cette perturbation hormonale est, entre autre, une spermatogenèse altérée ces hommes sont infertiles. Lorsqu'ils souhaitent avoir un enfant, ils sont traités par des hormones de substitution pendant environ 3 à 24 mois. Ces traitements sont longs et fastidieux car ils nécessitent 5 injections par semaine pendant toute la durée du traitement.

Nous avons développé une molécule potentiellement capable de traiter l'hypogonadisme avec une meilleure efficacité (durée du traitement serait donc plus courte), et un traitement moins contraignant pour le patient car les injections seraient beaucoup plus espacées. Pour confirmer notre hypothèse, nous allons réaliser des expériences sur 2 modèles animaux

- le modèle du rat adulte les rats sont traités de façon médicamenteuse pour les rendre hypogonadiques. Cette inhibition est réversible après arrêt du traitement.

- le modèle des souris hpg qui possèdent une mutation naturelle qui les rend hypogonadiques de naissance.

Au total, environ 1008 rats et 936 souris seront nécessaires sur 5 ans. Les paramètres relevés (poids des testicules, poids des vésicules séminales, réserves spermatiques, concentration de testostérone) seront comparés à l'aide d'un test de variance non paramétrique (Kruskal-Wallis) suivi d'un test post-hoc tel que le test de Dunn.

REMPACEMENT L'hypogonadisme ne peut être mimé par des systèmes ex vivo ou *in vitro*. Il peut être étudié chez des animaux hypophysectomisés. Etant donné la lourdeur d'une telle procédure pour les animaux et l'incertitude des résultats, nous nous sommes orientés vers des modèles moins invasifs et non douloureux pour l'animal. Nous allons utiliser les 2 modèles qui respectent le mieux le bien-être animal.

REDUCTION Les lots seront constitués de 4 animaux, pour obtenir une puissance de test de 80% avec un seuil de risque alpha de 0.05.

RAFFINEMENT Les conditions d'hébergement des animaux ne seront pas modifiées. Il y aura un enrichissement du milieu par ajout de copeaux (permet aux animaux de former des nids), et de jouets (loft rongeurs ou Dome Home) pour les rats et les souris. En cas d'isolement ou de prostration, ou de perte de poids d'un animal supérieur à 10% de son poids initial, l'expérimentation sur cet animal sera immédiatement interrompue. Le seul acte réalisé sur l'animal vivant est une injection par voie sous-cutanée.

15593 Les troubles du sommeil sont largement décrits dans les symptômes des troubles psychiatriques liés au stress, à l'anxiété et à la dépression. Il existe des influences bidirectionnelles entre stress et sommeil. Un sommeil perturbé peut générer des réponses comportementales et émotionnelles exacerbées en situation aversive. En ce qui concerne les modifications du sommeil, elles dépendent de la nature et de la durée du stress. Un stress aigu induit un éveil marqué et engendre des perturbations du sommeil. Un stress chronique est à la base d'altérations du sommeil à plus long terme, telles que l'insomnie chronique. La corticolibérine est un peptide sécrété par l'hypothalamus qui apparaît dans de nombreuses études, comme étant un facteur clé dans la médiation des effets du stress sur le sommeil. Récemment, il a été identifié que certains neurones de l'hypothalamus responsable de l'initiation et du maintien du sommeil expriment la corticolibérine. L'expression de ce peptide dans ces neurones renforce l'hypothèse de son implication dans la régulation du sommeil. Une forte augmentation du sommeil lent ainsi qu'une diminution de sommeil paradoxal ont été récemment décrites chez des souris soumises à un stress de soumission induit par un autre congénère. Ce modèle de stress chez la souris est pertinent car il mime les principaux traits

comportementaux observés chez les patients souffrant de troubles psychiatriques liés au stress tels que la dépression, l'anxiété généralisée et/ou les syndromes post-traumatiques.

L'objectif de ce projet vise à tester l'hypothèse selon laquelle les neurones responsables de l'initiation et du maintien du sommeil de l'hypothalamus sont impliqués à la fois dans la régulation du sommeil et dans les modifications du sommeil suite à un stress. Par conséquent, nous étudierons chez la souris les effets de l'activation ou de l'inhibition spécifiques de ces neurones sur le sommeil de base ainsi que sur celui qui suit une phase de stress. Pour ce faire, nous utiliserons des outils pharmacogénétiques qui permettent d'activer ou d'inhiber spécifiquement ces neurones pendant une période de plusieurs heures, et de manière réversible. La souris est le modèle le plus adéquat pour ces expériences qui ne peuvent être réalisées *in vitro* ou *in silico* (Remplacer). Les expériences ont été pensées de façon à réduire au maximum le nombre d'animaux requis pour ces expériences (Réduire). Ce nombre sera gardé au minimum nécessaire afin de pouvoir réaliser des tests statistiques sur les résultats obtenus et ainsi permettre leurs interprétations. Enfin, les expériences ont été pensées pour répondre à la question scientifique tout en réduisant au maximum l'inconfort et la douleur de l'animal. En effet, des anesthésiques locaux et généraux ainsi que des traitements analgésiques appropriés seront utilisés tout au long des procédures afin de préserver le bien-être des animaux (Raffiner). L'état général des souris sera régulièrement évalué afin d'identifier tout signe clinique ou comportementale nécessitant un soin ou un arrêt de protocole. Le projet sur 5 ans comprend 15 groupes expérimentaux et un maximum de 246 souris.

15594 L'autophagie est un processus physiologique qui régule l'homéostasie cellulaire. L'autophagie est un mécanisme d'adaptation cellulaire en condition de stress et son absence est souvent observée dans des maladies métaboliques, neurodégénératives et cancers. L'objectif de ce projet est d'évaluer les mécanismes moléculaires liés à l'induction de l'autophagie *in vivo*. Ce projet a été conçu dans le respect des 3 R : Remplacement, Réduction et Raffinement. Remplacement : Cette étude ne peut être conduite qu'*in vivo* car il n'y a pas de modèles alternatifs pour l'étude de l'activation de l'autophagie systémique. Nous avons sélectionné *in vitro* des composés capables d'induire l'autophagie. Nous avons besoin de réaliser des expériences *in vivo* chez les souris afin de pouvoir confirmer nos données obtenues *in vitro*. La finalité est d'évaluer l'efficacité de ces traitements. Réduction : Ce projet, d'une durée maximale de 5 ans, impliquera l'utilisation de souris immunocompétentes transgéniques déficientes pour l'autophagie comparées aux animaux sauvages (nombre totale d'animaux = 2256). Ce nombre d'animaux est le nombre maximal que nous envisageons d'utiliser. Pour la réalisation de cette étude, dans une 1^o phase, nous évaluerons l'induction de l'autophagie chez la souris par les molécules sélectionnées *in vitro*. Seules les molécules qui obtiendront les effets les plus significatifs seront par la suite utilisées dans les procédures suivantes pour évaluer leur impact sur l'alimentation, le métabolisme et la croissance tumorale. L'étude sera arrêtée si les manipulations initiales seront négatives par rapport à l'hypothèse de travail. Nous limiterons au maximum le nombre d'animaux par groupe de façon à obtenir des résultats statistiquement fiables. Nous chercherons à regrouper les expérimentations afin de réduire le nombre d'animaux contrôles. Raffinement : Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures a été mis au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et adapté en accord avec le personnel de l'animalerie (les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum; le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification, de tunnels en cartons et bâtonnets à ronger). Les animaux seront surveillés quotidiennement pour suivre leur comportement général. Nous nous efforçons à chaque instant de raffiner nos procédures afin de garantir le bien-être des animaux en cours de procédure grâce à une surveillance attentive (points limites) et des soins adaptés (anesthésie). Des points limites appropriés seront mis en place afin d'éviter toute angoisse et détresse des animaux. Une veille bibliographique constante sera faite pour éviter toute manipulation déjà rapportée dans la littérature. Le personnel impliqué dans ce projet est qualifié et expérimenté sur le plan technique et par ailleurs formé en continu sur les pratiques d'expérimentation animale.

15595 La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est la principale cause de déficit visuel irréversible de la personne âgée dans les pays occidentaux, affectant 1,5 millions d'individus en France. Avec le vieillissement, de la population, cette maladie représente un véritable enjeu scientifique, humain, social et économique. La DMLA est une maladie complexe qui affecte principalement, la vision centrale. C'est par la participation d'un consortium international que nous avons pu identifier par une étude d'association génétique des allèles à risque pour la DMLA, dont ceux dans le gène codant pour le transporteur du lactate SLC16A8. La perte de fonction des photorécepteurs chez la souris présentant une inactivation du gène SLC16A8 a démontré le rôle essentiel du transporteur du lactate dans la vision. Notre hypothèse principale est qu'une dérégulation du métabolisme du lactate par l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) contribue à la physiopathologie de la DMLA. Le projet proposé ici adresse à une approche thérapeutique dérivée de l'étude du promoteur du gène SLC16A8.

L'objectif est de localiser la région promotrice et les éléments régulateurs du gène SLC16A8, pour permettre le criblage de molécules capables d'augmenter son activité. Ces analyses seront réalisées sur la souris BALB/c. Les animaux seront ensuite euthanasiés et les yeux récupérés pour analyses biochimiques et histologiques. Au total 315 animaux seront nécessaires pour le projet.

Nous avons choisi l'expérimentation *in situ* chez la souris BALB/c, car cette approche est une stratégie « physiologique » pour cartographier des éléments régulateurs du gène SLC16A8, qui est exprimé spécifiquement dans l'EPR. Ces résultats permettront de diriger les études *in vitro* de type transfection cellulaire afin de cartographier précisément les éléments régulateurs du promoteur.

Le nombre d'animaux utilisé est le minimum requis pour atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus en respect de la « règle des 3R » Remplacer, Réduire et Raffiner. Ainsi, les tests statistiques seront effectués via le logiciel GraphPad. Nous utiliserons le test t de Student ou l'analyse de variance ANOVA suivi du test de Tukey ou de Dunnett. La significativité est définie à $p < 0.05$ ou moins. Le nombre d'animaux par groupe est le minimum requis pour obtenir des résultats interprétables et atteindre l'objectif scientifique défini dans ce projet. Aussi au cours du processus expérimental, les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries pour s'assurer de leur bien-être. Une signalétique particulière des animaux en expérimentation est utilisée et les conditions d'hébergement seront adaptées au modèle animal. Une période d'acclimatation de 5 jours sera mise en place.

15596 En nous basant sur notre expérience dans l'élucidation de voie de signalisation du stress et de la mort cellulaire, ainsi que sur nos connaissances en immuno-pharmacologie, nous proposons d'investiguer les effets de chloroquine, mefloquine, hydroxychloroquine et azithromycine *in vivo* pour déterminer leurs effets sur le stress, la mort cellulaire ainsi que le système immunitaire. La finalité du projet est d'obtenir des connaissances sur le mode d'action de ces molécules et pour identifier des marqueurs pharmacodynamiques et pharmacocinétiques dans le cadre de l'épidémie de Covid19. Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des expérimentations a été mis au point afin de respecter les exigences de remplacement, réduction et raffinement pour permettre une interprétation fiable des résultats dans le respect du bien-être animal. Remplacement Cette étude ne peut être conduite qu'*in vivo* car il n'y a pas de modèles alternatifs pour l'étude de l'activation du système immunitaire et ne peut donc pas faire l'objet de remplacement par d'autres techniques. Réduction Ce projet impliquera l'utilisation de souris immunocompétentes (nombre totale d'animaux = 1460). Ce nombre d'animaux est le nombre maximal que nous envisageons d'utiliser. Pour la réalisation de cette étude, nous évaluerons l'induction de l'autophagie chez la souris par les molécules sélectionnées *in vitro* ainsi que leur impact sur le microbiote et le métabolisme. Par la suite nous évaluerons leurs effets sur le système immunitaire lors de la croissance tumorale. L'étude sera arrêtée si les manipulations initiales seront négatives par rapport à l'hypothèse de travail. Nous limiterons au maximum le nombre d'animaux par groupe de façon à obtenir des résultats statistiquement fiables. Nous chercherons à regrouper les expérimentations afin de réduire le nombre d'animaux contrôles. Raffinement Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et adaptés en accord avec le personnel de l'animalerie (les animaux disposent de nourriture et d'eau *ad libitum*; le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification, de tunnels en

cartons et bâtonnets à ronger). Les animaux seront surveillés quotidiennement pour suivre leur comportement général. Nous nous efforçons à chaque instant de raffiner nos procédures afin de garantir le bien-être des animaux en cours de procédure grâce à une surveillance attentive (points limites) et des soins adaptés (anesthésie, etc.). Des points limites appropriés seront mis en place afin d'éviter toute angoisse et détresse des animaux. Une veille bibliographique constante sera faite pour éviter toute manipulation déjà rapportée dans la littérature. Le personnel impliqué dans ce projet est qualifié et expérimenté sur le plan technique et par ailleurs formé en continu sur les pratiques d'expérimentation animale. Nous préconisons que l'accomplissement de ce projet fournira des connaissances sur la régulation de la réponse immunitaire au virus pour la mise en place de stratégies thérapeutiques ciblées.

15597 Le traitement ou la prévention des hémorragies chez les patients hémophiles A repose sur l'injection intraveineuse de facteur VIII (FVIII) exogène. La complication majeure de ce traitement est l'apparition d'une réponse immunitaire anti-FVIII qui neutralisent le FVIII thérapeutique. La seule approche permettant une éradication des IgG anti-FVIII consiste en l'injection quotidienne de fortes doses de FVIII sur des périodes pouvant atteindre plusieurs mois à plusieurs années. Outre son coût (supérieur à 200 k€ par an et par patient) et son extrême lourdeur, ce traitement, appelé « Induction de Tolérance Immunitaire » (ITI), n'est efficace que chez 60 à 80% des patients. L'apparition d'IgG anti-FVIII représente donc une impasse clinique et la prise en charge de patients avec inhibiteurs lors d'une intervention chirurgicale devient alors extrêmement compliquée.

L'objectif de ce travail est de proposer une stratégie thérapeutique alternative destinée à éliminer de manière transitoire les anticorps inhibiteurs du FVIII en cas de chirurgie. Celle-ci repose sur l'injection d'enzyme Imlifidase ou IdeS, protéase dérivée de *Streptococcus pyogenes* capable de dégrader spécifiquement les IgG humaines. La validation et l'optimisation de cette approche seront obtenues chez la souris déficiente en FVIII, un modèle pré-clinique d'hémophilie A sévère. Le nombre de souris pour ces expériences est déterminé sur la base de prédictions statistiques de manière à être le plus bas possible. Le nombre total maximal de souris estimé pour ce projet est de 338 souris.

Les expériences sont planifiées en accord avec la règle des 3R afin de minimiser le nombre d'animaux remplacement, réduction, et raffinement.

Remplacement Le projet fera appel à différents modèles expérimentaux chez la souris. En effet, seule une approche expérimentale *in vivo* permet de rendre compte de la complexité des systèmes biologiques. Toutefois, toute information obtenue par l'expérimentation animale sera immédiatement transposée à des systèmes *in vitro* pour analyses ultérieures.

Réduction Nous réduirons le nombre d'animaux par une analyse préalable poussée de la littérature scientifique pour maximiser les approches expérimentales. Des expériences *in vitro* seront menées en amont pour optimiser les méthodes et diminuer au maximum le nombre d'animaux par lots. Ainsi, des analyses de puissance seront-elles effectuées pour calculer le nombre minimum d'animaux par groupe tout en garantissant la solidité statistique des résultats.

Raffinement Les souris seront hébergées en accord avec les lois d'éthique européennes. Les animaux seront contrôlés quotidiennement pour évaluer et réduire au maximum tout risque de douleur. Les gestes susceptibles d'entraîner une douleur seront réalisés sous anesthésie gazeuse ou après injection d'un mélange de substances anesthésique et analgésique selon les procédures. Les conditions de vie seront améliorées au maximum (5 souris maximum par cage, ajout de nids végétaux et de tunnels en carton).

15598 L'épithélium intestinal est un système en constant renouvellement cellulaire à partir de cellules souches. En dépit des progrès importants réalisés au cours de ces dernières années, les mécanismes moléculaires et cellulaires contrôlant la prolifération et la différenciation cellulaire qui sous-tendent ce renouvellement cellulaire sont encore imparfaitement élucidés. L'objectif de ce projet de recherche vise premièrement à étudier le rôle de la machinerie transcriptionnelle de base au cours du développement embryonnaire de l'intestin chez la souris adulte, et deuxièmement sa régulation des différents types cellulaires différenciés de l'intestin. La réalisation de ce projet devrait

apporter des informations originales concernant les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans le développement et l'homéostasie intestinale, et leur dérégulation dans les cancers de l'intestin. A terme, la compréhension de ces mécanismes est susceptible de déboucher sur l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement de ces cancers. Le projet nécessitera l'emploi de différents modèles transgéniques de souris. Au total, il est envisagé l'utilisation de 322 souris pour la réalisation du projet sur 5 ans. La règle des 3R sera appliquée pour l'ensemble des souris.

Réduire. Les chiffres indiqués dans le dossier correspondent au nombre maximal d'animaux utilisés pour les expériences envisagées. Sur la base de notre expérience et de la littérature, un nombre d'animaux minimum et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement significatifs a été choisi.

Remplacer. Ces expériences ont pour objectif d'étudier les conséquences structurales et fonctionnelles de la perte d'expression de TAF4 ou de Numb sur l'organisme incluant le microenvironnement (fibroblastes, cellules immunitaires, microbiote...). Elles ne peuvent être réalisées que sur des animaux vivants et non sur des cultures cellulaires. Néanmoins, l'utilisation d'organoïdes en culture *ex vivo* dérivés du tissu intestinal d'animaux transgéniques permettra de remplacer les animaux pour les études ne nécessitant pas la prise en compte d'un organisme complet. Raffiner.

Les animaux seront hébergés dans des conditions sanitaires contrôlées et permettant un bien-être optimal (ex. carrés de coton pour la fabrication des nids, balançoires). Les procédures ont été réfléchies afin de réduire au maximum le stress et les souffrances des animaux soumis aux expérimentations. Les animaux seront surveillés très régulièrement durant les procédures. En cas d'apparition de signes de souffrance au cours des protocoles (ex. perte de poids, pelage dégradé, prostration), les animaux seront traités contre la douleur ou les procédures seront arrêtées.

15599 La capacité de garder en mémoire une expérience est essentielle pour la survie des organismes supérieurs. Cette capacité est en partie assurée par une structure cérébrale appelée hippocampe. Cette structure est composée de cellules appelées "neurones". Ces derniers sont connectés entre eux, et sont capables de modifier leurs connexions en fonction des informations qu'ils reçoivent, autrement dit, ils sont capables de « plasticité synaptique ». Les informations qu'ils reçoivent peuvent les activer ou les rendre silencieux. Toutes les informations reçues sont précisément intégrées de manière à coder et transmettre au mieux les messages nerveux. L'hippocampe est divisé en plusieurs sous-régions, connues pour jouer différents rôles. Parmi ces sous-régions, CA3 est impliqué dans la mémoire des événements vécus dans leurs contextes ou mémoire épisodique. Des études ont montré que les oscillations générées par la synchronisation des neurones de l'hippocampe traduisent de l'état comportemental de l'animal et jouent un rôle dans l'encodage et la consolidation de ce type de mémoire. Cependant, le fonctionnement *in vivo* des neurones de CA3, leur relation avec les oscillations hippocampiques, et le rôle joué par la plasticité synaptique du gyrus denté dans ce contexte n'ont pas encore été étudiés. Le projet propose d'étudier le fonctionnement des neurones de CA3 *in vivo* lors de différents états de veille et le rôle joué par la plasticité synaptique du gyrus denté dans la transmission de ce signal, à l'aide d'enregistrements de neurones chez la souris éveillée. Cela serait fait dans une lignée de souris au phénotype non dommageable dans laquelle la plasticité synaptique entre le gyrus denté et CA3 est abrogée. Il est en outre possible de rendre silencieuse une population de neurones en y faisant s'exprimer des protéines les rendant sensibles à certains composés chimiques. Ces manipulations permettront d'enregistrer la réponse des neurones de CA3 après inhibition des neurones se situant en amont, dans le gyrus denté de l'hippocampe et ainsi en abroger la plasticité. En corrélant l'activité de ces neurones vis-à-vis des oscillations de l'hippocampe et des comportements de l'animal, nous pouvons élucider le fonctionnement des circuits de CA3 dans un contexte physiologique. Pour ce faire, nous enregistrerons, en simultané, l'activité de dizaines de neurones grâce à des électrodes très fines placées au préalable dans les régions cérébrales impliquées. La richesse des informations collectées et le grand nombre de neurones enregistrés via cette méthode sont tels qu'il nous sera possible de réduire considérablement le nombre d'animaux utilisés. Cette étude permettra de mieux comprendre les mécanismes cellulaires à l'origine de l'encodage et la consolidation de la mémoire.

Les données déjà récoltées et analysées au laboratoire concernant l'activité et la dynamique des neurones de CA3 lors de différents états de veille montrent une importante modulation de l'activité des neurones en fonction de différents états cérébraux. Nous souhaitons donc compléter ces données et étudier le rôle des informations reçues par le gyrus denté au cours de différents états de veille sur l'activité et les modulations précédemment rapportées dans les neurones de CA3. Ces informations ont été proposées comme jouant un rôle dans l'encodage et le rappel efficace de la mémoire. Pour cela nous inhiberons le gyrus denté pendant les enregistrements électrophysiologiques des cellules de CA3.

Ce projet respecte la règle des 3R : pour le R de remplacer, bien que de nombreuses données existent quant à l'activité des neurones dans des modèles de culture *in vitro*, ce projet se propose d'étudier le fonctionnement des neurones dans un contexte physiologique et intact. Cela nécessite donc d'effectuer les expériences *in vivo* chez l'animal vigile. Pour le R de réduire, nous limitons les groupes expérimentaux de manière à pouvoir réaliser dans le temps imparti les expériences nécessaires mais également l'analyse de ces dernières qui prend un temps conséquent.

L'expertise du laboratoire nous a permis d'établir que malgré la difficulté technique connue de ces expériences, un enregistrement de qualité était obtenu pour 1 animal sur 2 en moyenne. Pour pouvoir effectuer des analyses statistiques robustes, nous savons qu'environ 20 animaux sont nécessaires par groupe.

Pour le R de raffiner, toutes les procédures seront réalisées par une personne formée et ont été optimisées pour soulager le stress et la douleur des animaux tout au long de cette étude. Ainsi, toute chirurgie est réalisée sous anesthésie générale avec contrôle de la température corporelle. Une couverture antalgique permettra une limitation de la douleur pendant et après le réveil de l'animal. Les animaux seront surveillés quotidiennement par l'expérimentateur, du jour de la chirurgie jusqu'à la fin de l'expérimentation. Des points limites sont définis et décrits dans les procédures pour éviter la souffrance des animaux. De plus, un enrichissement des cages constitué de maisons en papier mâché seront utilisés pour permettre aux animaux de se cacher et établir des liens sociaux entre eux.

Ainsi, ce projet nécessite l'utilisation au total de 160 souris sur 3 ans. Ce chiffre tient compte des différents contrôles et si cela est possible, le nombre d'animaux sera revu à la baisse en cours d'expérimentation.

15600 Dans l'organisme, le système immunitaire utilise des glycoprotéines, appelées anticorps, pour localiser et neutraliser les agents infectieux ou tout autre antigène de manière spécifique. Ils sont sécrétés par les globules blancs de l'organisme, présents principalement dans le sang et les organes lymphoïdes.

Parce qu'ils sont spécifiques, les anticorps sont très largement utilisés comme des outils de tests diagnostics, mais également comme des médicaments permettant de bloquer certaines cibles cellulaires, bactériennes ou virales et sont, par conséquent, employés dans des domaines très variés, à l'image de la médecine ou de la biologie.

Les anticorps permettent de repérer de manière spécifique des protéines. Ils sont largement utilisés dans nos expériences pour mettre en évidence certains événements biologiques. Le but de ce projet est de produire ces anticorps. Les différentes méthodes de production reposent toutes sur l'utilisation initiale d'animaux, qui développeront des anticorps après immunisation. Ces anticorps pourront être produits, soit par culture cellulaire d'hybridomes (cellules produisant et sécrétant les anticorps), soit dans le liquide d'ascite d'un animal. La réussite de ces techniques est propre à chaque anticorps il est impossible de prévoir la réussite d'une technique par rapport à une autre.

La méthode de production favorisée reste celle de la culture cellulaire *in vitro*, qui permet de produire une quantité d'anticorps raisonnable (plusieurs mg) sur un temps assez long (plusieurs mois). La méthode de production via liquide d'ascite, présente, quant à elle, l'avantage de produire des quantités plus importantes (plusieurs dizaine ou centaine de mg) dans un temps réduit. La quantité d'anticorps souhaitée dépend des futures utilisations envisagées.

Remplacement : Le but de ce projet est de produire différents anticorps monoclonaux, spécifiques d'un motif représenté sur une protéine. Chaque anticorps monoclonal est issu d'une même lignée cellulaire et reconnaît une même cible ou même protéine.

La culture cellulaire d'hybridomes *in vitro* à grande échelle n'a pas permis de produire une quantité suffisante d'anticorps pour nos besoins expérimentaux. Le recours à la technique de production par liquide d'ascite est donc nécessaire pour la poursuite de notre projet.

Réduction : Le nombre d'animaux utilisé lors de ce projet est réduit au minimum, ce nombre étant fixé à 10 souris/hybridome. Le nombre de souris par groupe a été défini par de précédentes expériences réalisées au laboratoire, utilisant cette technique de production. Ce nombre inclut les différences de rendements interindividuels.

Raffinement : Un soin particulier sera apporté afin de diminuer le stress et la douleur de tous les animaux utilisés dans ce projet

- Hébergement dans des cages munies de particules de bois et enrichie avec un carré en coton compressé et de frisure de papier, afin de permettre aux animaux de réaliser un nid et de compartimenter leur environnement conformément à leurs besoins comportementaux
- Injection d'analgésique et/ou d'anti-inflammatoire avant la procédure. Ce traitement sera adapté selon besoin, après évaluation de l'état de santé de l'animal et avis vétérinaire.

Pendant toutes les expérimentations, les animaux sont surveillés par du personnel entraîné. L'établissement de points limites a été établi afin de pouvoir interrompre la procédure en cas de souffrance de l'animal.

Cette étude nécessitera l'utilisation de 70 souris.

15601 Des résultats obtenus au sein de notre laboratoire ont démontré le rôle crucial de la flore intestinale dans l'efficacité de traitements anti-cancéreux. Chez les patients atteints d'un cancer, de nombreux facteurs entraînent un déséquilibre de la flore intestinale mais également une altération de l'état général de l'intestin. L'intestin devient alors trop perméable et perd sa fonction de barrière contre les éléments indésirables pouvant alors entrer dans l'organisme.

L'objectif de cette étude est d'élucider le phénomène/voie impliqué dans la détérioration de l'intégrité intestinale induite par la présence d'une tumeur et d'améliorer les réponses aux immunothérapies en rétablissant l'intégrité intestinale.

Pour cela, nous allons analyser différentes voies susceptibles d'être impliquées dans l'intégrité intestinale les catécholamines, les glucocorticoïdes, le système immunitaire, l'autophagie, le microbiote, l'alimentation, l'obésité ou encore les métabolites.

Ce projet nécessite des procédures expérimentales utilisant des animaux vivants et plus particulièrement la souris. Pour la réalisation de ce projet, l'utilisation d'animaux vivants est indispensable car seul un animal vivant, entier, peut permettre d'étudier dans leur globalité, le microbiote, le métabolisme, l'immunité anti-tumorale et l'effet des immunothérapies sur la réponse anti-tumorale dans un contexte tumoral, avec toutes les interactions nécessaires, impossibles à reproduire *in vitro* ou *ex vivo*. Le projet nécessitera 3672 souris. Ce nombre important d'animaux se justifie par les différentes combinaisons thérapeutiques, les différentes voies étudiées, les différents adjuvants et les différents types de cellules tumorales utilisés. Les procédures expérimentales mises en jeu respecteront les exigences de remplacement, réduction et raffinement. Les groupes seront constitués d'un minimum d'animaux assurant la fiabilité des résultats en termes de statistiques. Le nombre de prélèvements pré- et post-mortem seront optimisés afin d'étudier le plus de paramètres possibles et ainsi d'éviter la répétition d'expérimentation. Enfin, les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux, en ayant recours à l'anesthésie locale ou générale dépendant des gestes techniques.

Les contraintes principales pour les animaux seront pour certaines procédures l'implantation de tumeurs. Ces contraintes seront limitées par un suivi très strict avec application de points limites, limitation des tailles de tumeurs par mesure physique (sous-cutanée) ou au moyen d'imagerie

optique de luminescence des animaux (qui permet aussi un suivi longitudinal non invasif plus raffiné).

15602 L'autisme (ou troubles du spectre autistique) est un trouble du développement caractérisé par une communication perturbée, une interaction sociale altérée, ainsi que la présence de comportements restreints et répétitifs. Nous souhaitons analyser et comprendre comment les malformations/anomalies à l'origine des pathologies neurodéveloppementales sont générées, ainsi que la façon dont les réseaux neuronaux sont altérés durablement, avec l'hypothèse que ces altérations commencent *in utero* et/ou à la naissance. Le syndrome de Rett (SR) est une pathologie d'origine génétique qui présente des composantes de type autistiques importantes.

Notre projet vise à explorer ainsi les éventuelles altérations des systèmes de neurotransmission au cours des périodes développementales avec comme objectif final d'améliorer notre compréhension des modifications présentes dans les neurones de type « autistes » dans le modèle murin du SR.

Pour ce projet, nous allons utiliser des souris génétiquement modifiées pour inactiver le gène MeCP2. Ces souris présentent des symptômes qui rappellent les troubles décrits chez les patients atteints du syndrome de Rett, et donc un phénotype dommageable. En effet, ces souris présentent des difficultés respiratoires sévères, des problèmes de locomotion, ainsi qu'une perte de poids (à partir de 30 jours postnatal (P30) pour les mâles et P180 pour les femelles). Nous allons faire appel au total à 264 souris dans une période de 3 ans. La nature de ce projet ne rend pas possible de le reproduire, ni de l'étudier dans des modèles de cultures cellulaires *in vitro*.

Ce projet a été planifié pour appliquer au mieux les principes de réduction et de raffinement dans le respect de la règle des 3R permettant de limiter le nombre d'animaux utilisés. Les animaux seront hébergés en groupes sociaux en cages équipées de l'enrichissement de base (maison en carton pour rongeurs qui permet aux animaux de dormir et de se reposer, en plus de participer à leur exercice physique grimper et explorer) et de matériaux de nidification, et dans un environnement avec température, lumière et hygrométrie contrôlées avec accès *ad libitum* à la nourriture et à l'eau. Pour prendre en compte le principe de réduction, les données seront analysées en fonction de la progression des résultats, permettant d'éviter les expériences inutiles. Si possible, nous appliquerons plusieurs protocoles par expérience, pour minimiser le nombre d'animaux utilisés. Le bien-être des animaux sera surveillé quotidiennement via la mesure de leurs poids et l'observation de leur aspect physique et comportemental. Si nécessaire, des mesures seront prises pour réduire leur stress et leur douleur. Avant toute manipulation douloureuse, une combinaison d'anesthésique et sédatif sera administrée avec une dose calculée en fonction du poids de chaque animal. Pour soulager le stress, les animaux seront d'abord familiarisés avec l'expérimentateur et habitués à la salle d'expérimentation.

15603 Dans le cadre des enseignements suivis par les étudiants inscrits en cursus de master de Biologie à l'université, nous souhaitons proposer des travaux pratiques (TP) pour leur montrer comment une expérimentation de laboratoire peut fournir des résultats utiles à la caractérisation et à la quantification des effets d'un contaminant modèle (mercure inorganique) et de sa bioaccumulation tels que décrits en cours d'Ecotoxicologie par les enseignants. Cette activité pratique passera par la mise en place d'une expérimentation annuelle en laboratoire au cours de laquelle les étudiants suivront la contamination d'unités expérimentales (aquariums) comprenant différents types d'organismes végétaux (plantes aquatiques flottantes lentilles d'eau et enracinées Elodées) et animaux (palourdes asiatiques et poissons-zèbre). La multiplicité des types d'organismes testés permettra aux étudiants de comparer la sensibilité des différentes espèces face à une contamination du milieu aquatique en terme de bioaccumulation et de croissance. Le contaminant choisi est le mercure inorganique reconnu comme étant bioaccumulable par les organismes vivants. Il sera appliqué à deux concentrations sub-létales (faible et modérée et nulle pour les contrôles,) et à deux températures (20 et 26°C). Les plantes le bioaccumulent de manière importante, les bivalves un peu moins et les poissons encore moins grâce aux mécanismes de détoxification qu'ils mettent en place dans leurs cellules. L'espèce de poisson choisi est le poisson-zèbre, modèle expérimental classiquement utilisé en recherche et en toxicologie, présentant une grande robustesse en

expérimentation et une stabulation aisée. A l'issue et au cours de l'expérience, les étudiants compareront les niveaux de contamination des différents types d'organismes exposés aux deux concentrations sub-létales de mercure inorganique par rapport aux contrôles. L'expérimentation unique annuelle durera 21 jours, et nécessitera 54 poissons/an à raison de 3 poissons/aquarium (3 aquariums par condition d'exposition), soit 270 poissons pour les 5 années du projet. Ce nombre a été défini et optimisé au maximum afin de sacrifier le moins d'organismes possible et obtenir des résultats statistiquement interprétables. Les poissons seront élevés, exposés et euthanasiés selon les règles éthiques édictées par la réglementation sur l'expérimentation animale. Des conditions optimisées au maximum leur seront offertes pendant leur accueil au laboratoire et en expérimentation : faible densité (<1 poisson/3 L), présence de plantes aquatiques et de substrat sédimentaire pour un environnement complexe, alimentation ad libitum, oxygénation par bullage, température contrôlée, et renouvellement régulier partiel de l'eau. Notre laboratoire dispose du matériel nécessaire et du personnel qualifié pour le maintien dans de bonnes conditions des poissons-zèbres (confort et acclimatation des poissons respectés au maximum, stress réduit au minimum) de manière à satisfaire au bien-être animal.

15604 L'arthrose (osteoarthritis, OA) est une pathologie des articulations qui se caractérise par une érosion progressive du cartilage articulaire, un remodelage osseux sous-chondral ainsi qu'une inflammation observable au niveau de la membrane synoviale. Cette composante inflammatoire joue un rôle clé dans la maladie puisqu'elle est liée à une augmentation de la dégradation du cartilage et de la douleur. A ce jour, il n'existe aucun traitement capable d'enrayer l'évolution du processus arthrosique. Les cellules souches mésenchymateuses (MSC), en raison de propriétés régénératives qu'elles exercent à travers la sécrétion de facteurs immunomodulateurs, anti-apoptotiques, anti-fibrotiques et anti-inflammatoires, apparaissent comme une solution thérapeutique prometteuse dans le traitement de l'arthrose. Les études précliniques animales et les essais cliniques de phase I ou II ont notamment montré que l'injection intra-articulaire de MSC était sûre et bien tolérée. Les injections intra-articulaires de MSC dérivées de la moelle osseuse (BM-MSC) ont démontré la capacité des MSC à réduire la gravité clinique de l'OA. Cependant, l'effet thérapeutique des MSC chez l'Homme demeure modeste et doit être amélioré pour garantir des bénéfices thérapeutiques à long terme et les transformer ainsi en un traitement efficace de l'arthrose.

Des données récentes suggèrent un rôle du récepteur nucléaire PPAR β/δ dans le développement et la sévérité de l'OA chez la souris. Il a également été démontré que le niveau d'expression de PPAR β/δ permettait de prédire le potentiel immunomodulateur des MSC murines, son inhibition stimulant leurs effets thérapeutiques dans l'arthrite murine.

Compte tenu de l'effet thérapeutique prometteur des MSC dans l'OA et du rôle potentiel de PPAR β/δ dans les propriétés immunomodulatrices des MSC, l'objectif de notre projet est d'étudier l'influence de la modulation de PPAR β/δ sur les propriétés anti-arthrosiques des MSC humaines et murines dans un modèle d'arthrose post traumatique chez la souris C57BL/6Jrj.

La procédure expérimentale n°1 a pour objectif de comparer l'effet de l'injection intra-articulaire de MSC humaines et murines issues de moelle osseuse (BM-MSC) modulées pour PPAR β/δ sur l'évolution de l'arthrose.

Une arthrose post-traumatique unilatérale sera induite chirurgicalement par déstabilisation du ménisque médial droit (DMM) chez 120 souris C57BL/6Jrj mâles. Une semaine après l'induction d'arthrose par DMM, les souris recevront une injection intra-articulaire de $2 \cdot 10^5$ MSC dans 5 μ l de PBS.

Les 120 souris seront réparties en 8 groupes de 15 souris en fonction du type de MSC

- 1 groupe de 15 souris recevra une injection intra-articulaire de 5 μ l de PBS (lot 1 CT).
- 4 groupes de 15 souris recevront une injection intra-articulaire de $2 \cdot 10^5$ BM-MSC murines dans 5 μ l de PBS (soit $2 \cdot 10^5$ BM-MSC murines sauvages (lot 2) soit $2 \cdot 10^5$ BM-MSC murines KO PPAR β/δ (lot 3) soit $2 \cdot 10^5$ BM-MSC murines traitées avec un agoniste de PPAR β/δ (lot 4) soit $2 \cdot 10^5$ BM-MSC murines traitées avec un antagoniste de PPAR β/δ (lot 5).

- 3 groupes de 15 souris recevront une injection intra-articulaire de 2. 10⁵ BM-MSC humaines dans 5 µl de PBS (soit 2. 10⁵ BM-MSC humaines CT (lot 6) soit 2. 10⁵ BM-MSC humaines traitées avec un agoniste de PPARβ/δ (lot 7) soit 2. 10⁵ BM-MSC humaines traitées avec un antagoniste de PPARβ/δ (lot 7).

12 semaines après induction d'arthrose, les souris seront sacrifiées par dislocation cervicale. Les pattes seront prélevées pour évaluer le niveau d'arthrose par des analyses moléculaires, radiologiques, histologiques et immuno-histochimiques.

Ce projet prend en compte la règle des 3R

- Le nombre d'animaux a été réduit au nombre minimal requis pour chaque type de test afin d'atteindre une significativité statistique soit 15 animaux par groupe pour la procédure expérimentale 1, ce qui fait un total de 120 souris.

- Le raffinement est mené en réduisant la douleur lors des expérimentations afin d'améliorer la reproductibilité et la qualité de l'expérimentation. Ainsi, une analgésie péri-opératoire immédiate est prévue par administration de buprénorphine et meloxicam en pré chirurgie et post chirurgie. Les souris seront hébergées à raison de 5 souris par cage. Elles seront observées et pesées avant la chirurgie et les 3 premiers jours après la chirurgie, puis 2 fois par semaine jusqu'à la fin de l'expérimentation. Par ailleurs, des points limites ont été identifiés et les procédures à mettre en place lors de l'atteinte de ces points limites ont été décrites.

- Malheureusement, le remplacement de cette expérimentation animale par un modèle *in vitro* est impossible car cette étude visant à déterminer l'efficacité thérapeutique de MSC modulées pour PPARβ/δ sur l'arthrose, ne peut se faire que sur un modèle *in vivo* d'arthrose, permettant d'analyser l'ensemble de l'articulation et les différents tissus qui la composent.

15605 Le gène *teashirt 3* code pour un facteur de transcription exprimé au cours du développement et chez l'adulte dans de nombreuses structures nerveuses. Il pourrait permettre aux neurones d'acquérir une identité et/ou un mode de fonctionnement particulier. Chez la souris, il est essentiel, par exemple, au développement ou à la mise en place de l'activité rythmique d'une partie des neurones du tronc cérébral qui contrôlent la respiration. Sa fonction dans d'autres structures nerveuses reste encore assez peu connue. Il a cependant été associé chez l'homme à certaines pathologies neurodéveloppementales incluant les troubles du spectre autistique (TSA). Des méthodes d'imagerie et de spectroscopie par résonance magnétique (IRM et SRM) ont révélé des anomalies cérébrales tant volumétriques morphologiques, microstructurales, métaboliques que fonctionnelles chez des enfants et des adolescents atteints de TSA. Cependant, même si 60% des cas de TSA ont une origine génétique, plus de 1000 gènes ont été associés à ces troubles. Cette hétérogénéité complique l'interprétation des données obtenues chez l'homme. Le but de ce projet est donc de caractériser par IRM et SRM le phénotype anatomique, métabolique et fonctionnel du cerveau de souris ou une seule copie du gène *teashirt 3* a été délétée. Cette étude sera conduite dans le respect du principe éthique des 3 R (Remplacement, Réduction, Raffinement). De telles études sur le cerveau ne peuvent pas encore être faites sur des modèles "*in vitro*". La souris reste donc indispensable comme modèle d'étude d'une pathologie humaine neurodéveloppementale caractérisée principalement par des troubles comportementaux comme le sont les TSA. Différentes lignées de souris peuvent également être utilisées pour suivre l'impact fonctionnel et comportemental d'une délétion globale (constitutive) ou limitée, dans l'espace (conditionnelle) et/ou dans le temps (inductible), d'un gène d'intérêt. Dans ce modèle, l'identification des structures dont le dysfonctionnement conduirait à des troubles comportementaux pourrait de plus permettre d'envisager l'inactivation ou la reprogrammation des neurones qui les constituent.

Le recours à l'animal étant incontournable, nous veillerons à réduire le nombre d'animaux grâce à l'utilisation de méthodes d'exploration non-invasives permettant le suivi longitudinal des animaux et le recueil sur un même animal d'un jeu complet de données anatomiques, métaboliques et fonctionnelles. Les animaux seront explorés sur des spectromètres imageurs précliniques dédiés à la souris. Le raffinement concernera la diminution du stress grâce à l'utilisation de l'anesthésie avec monitoring physiologique pour les explorations par IRM/SRM. Un délai d'acclimatation minimum de

7 jours et une habitude à l'expérimentateur seront aussi assurés. Les animaux seront hébergés en groupes sociaux, avec cycle jour/nuit, nourriture et boisson ad libitum et enrichissement environnemental. Les cages contiendront des rondins de bois à ronger, du coton pour la nidification, un refuge en plastique, et une roue fast-track avec igloo afin de diminuer les comportements agressifs, réduire l'ennui et favoriser l'expression d'un maximum de comportements naturels (interactions sociales, locomotion, repos, fabrication d'un nid, recherche de cachette).

Nous estimons qu'environ 30 souris seront nécessaires pour obtenir des résultats fiables. L'incidence des TSA est en forte progression depuis les années 80 et touchent actuellement 1 enfant sur 68 naissances. Ce projet devrait permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pouvant contribuer à améliorer le traitement des TSA.

15606 La prise en charge des douleurs des patients est une préoccupation récurrente des médecins. Bien que des médicaments antidouleurs existent, leurs actions présentent des limites et certaines douleurs sont résistantes aux traitements actuellement disponibles. Les difficultés de prise en charge proviennent surtout du fait qu'il n'y a pas une mais des douleurs dont les mécanismes sont différents. Les douleurs peuvent être divisées en deux principaux types les douleurs nociceptives et les douleurs neuropathiques, bien que des formes mixtes sont également décrites.

Les douleurs nociceptives sont dues à une lésion d'une partie du corps, sans atteinte des nerfs. En revanche, les douleurs neuropathiques sont directement liées à l'atteinte des nerfs. Même si ces lésions nerveuses peuvent avoir des origines diverses, bien souvent, l'inflammation des tissus joue un rôle important.

Dans ce projet, il est question de tester des molécules antidouleurs pour traiter les douleurs neuropathiques, très mal prises en charge par les médicaments actuellement sur le marché.

Dans ce but, nous observons l'effet de nouvelles molécules sur des souris auxquelles une douleur de type neuropathique est induite pharmacologiquement.

Dans le cadre du respect de la règle des 3R,

Remplacement aucune méthode de remplacement n'est disponible pour étudier la problématique du présent projet. En effet, la douleur neuropathique implique des interactions multiples et complexes. Bien qu'il soit possible de disséquer les événements individuels en détail avec des études *in vitro*, toutes les interactions impliquées dans la réponse *in vivo* ne sont pas possibles à simuler *in vitro*. Néanmoins, les molécules testées dans ce projet ont fait l'objet d'une sélection sur des tests *in vitro* afin de choisir celles qui ont le plus fort potentiel dans l'indication thérapeutique testée.

Raffinement le bien-être des animaux est primordial durant les expérimentations. Ainsi, de nombreuses mesures sont mises en œuvre, notamment l'inclusion d'une phase d'acclimatation avant toute expérimentation, de conditions d'hébergement adaptées (maintien des animaux en groupes sociaux, respect de l'espace minimum pour chaque animal, accès à l'eau et à la nourriture à volonté, enrichissements appropriés comme des tunnels, de la frisure et des maisonnettes, personnel formé), une visite quotidienne au minimum, une gestion de la douleur suivant une échelle stricte et des points limites bien établis. Réduire nous cherchons toujours un compromis expérimental qui permet de réduire le nombre d'animaux utilisés. Chaque groupe expérimental d'un plan d'étude comporte 10 animaux afin d'obtenir un résultat statistiquement satisfaisant.

Sur une période de 5 ans, l'utilisation de 3 740 souris est envisagée afin de participer au test d'environ 60 molécules.

15607 I. Introduction

Une des principales classes d'agents anticancéreux est les génotoxiques, qui endommagent l'ADN, bloquent la prolifération et tuent les cellules cancéreuses. Un problème fréquent en clinique est l'apparition de résistance aux chimiothérapies. Nous avons identifié *in vitro* 3 gènes impliqués dans un processus appelé « épissage alternatif » qui joue un rôle dans le développement des cancers et

dans la résistance aux chimiothérapies et en particulier à la doxorubicine, agent génotoxique fréquemment utilisé pour le traitement de cancers du sein.

II. Objectifs du projet

Après l'obtention de résultats préliminaires *in vitro* prometteurs, ce projet a pour but de mieux comprendre le rôle de l'épissage alternatif dans la résistance aux chimiothérapies anticancéreuses. Pour cela, nos objectifs sont

- 1) évaluer *in vivo*, par greffe chez la souris, la croissance tumorale et la sensibilité à la doxorubicine de lignées cellulaires humaines de cancer du sein
- 2) tester l'effet de l'inhibition de 3 gènes impliqués dans l'épissage alternatif sur l'efficacité anti-tumorale de la doxorubicine.

III. Avantages et dommages escomptés

Ce projet devrait permettre de mettre en évidence le rôle de gènes impliqués dans l'épissage alternatif, dans la chimiorésistance.

Les modèles de lignées cellulaires sont idéaux pour identifier de nouveaux acteurs et mécanismes moléculaires, mais sont limités pour une interprétation pré-clinique. Ainsi, l'utilisation de modèles animaux tels que la souris est indispensable pour mener à bien ce projet. L'injection de lignées tumorales, la croissance de tumeurs et les injections de composés sont des dommages inévitables.

IV. Utilisation de modèles animaux

Pour ce projet, nous prévoyons d'utiliser au maximum 340 souris sur 5 ans.

Ce nombre a été défini à l'aide d'outils statistiques de façon à limiter les animaux utilisés tout en s'assurant d'obtenir des résultats exploitables.

En accord avec les recommandations internationales dans le domaine de la cancérologie, les animaux seront observés quotidiennement afin d'assurer leur bien-être et des mesures adéquates seront prises pour arrêter immédiatement leur souffrance.

Leurs conditions d'hébergement seront optimisées pour limiter leur stress, avec par exemple, l'ajout d'éléments de raffinement comme des rondins de bois ou de coton dans les cages.

15608 Le Coronavirus SARS-CoV-2 a infecté plus de 3 millions de personnes et provoqué plus de 240 000 décès, nécessitant un confinement des populations à travers le monde pour limiter la pandémie. Les patients sont atteints de pathologies respiratoires, qui peuvent engendrer des pneumopathies sévères nécessitant une hospitalisation dans les services de réanimation, qui risquent d'être submergés par l'afflux des patients. Il n'existe pas de traitement thérapeutique spécifique, ni de vaccin, et les modèles animaux existants sont insuffisants pour étudier la physiopathologie de la maladie et développer ces traitements ou vaccins.

Ce virus présente un tropisme d'espèce restreint par le récepteur d'entrée virale, l'enzyme ACE2 humain (hACE2), qui n'est pas reconnu chez la souris. La réponse immunitaire antivirale est essentielle pour contrôler la progression de la pathologie, or dans de nombreux cas, des pathologies sévères et une mortalité importante sont associées à des réponses immunitaires exacerbées caractérisées par des orages cytokiniques. La balance entre la réponse immunitaire antivirale curative ou délétère constitue une des clés pour comprendre la pathologie. Etant donné que le SARS-CoV-2 n'infecte pas les souris, et que les souris transgéniques qui expriment hACE2 sont susceptibles au virus, mais l'éliminent naturellement au bout de 8-10 jours, un modèle de souris alternatif sera nécessaire pour analyser les réponses immunitaires et tester des thérapies ou des vaccins.

Notre laboratoire a une grande expertise de la modélisation des pathologies humaines chez des souris immunodéficientes greffées avec des cellules humaines (souris humanisées). Afin d'étudier les réponses immunitaires contre SARS-CoV-2, nous établirons 3 modèles de souris : le premier avec un poumon humain greffé (HuLung), le deuxième avec un poumon humain greffé et un système immunitaire reconstitué de cellules humaines (HIS-HuLung), et le troisième avec un système immunitaire humanisé (HIS) qui exprime le récepteur de SARS-CoV-2 hACE2 (HIS-hACE2). Nous caractériserons les phénotypes du greffon de poumon et des cellules immunitaires

humaines chez ces nouveaux modèles. Ces souris humanisées seront infectées par SARS-CoV-2 afin d'étudier les interactions hôte-virus dans les cellules humaines, puis tester des molécules thérapeutiques ou des stratégies vaccinales.

Les souris mâles et femelles, d'un âge variable (8 semaines à 18 mois) pourront être utilisées.

Nous serons attentifs au respect de la règle des 3R de la manière suivante

Remplacement Aucun modèle *in vitro* ne peut reproduire la complexité de la pathologie de la Covid-19 et aucun ne permet de tester des stratégies vaccinales.

Réduction Pour établir les modèles de souris humanisés nous utiliserons les techniques déjà mises en place dans le laboratoire, cette expérience acquise nous permet de réduire le nombre d'animaux expérimentaux dans ces cohortes. Pour chacun des 3 groupes d'animaux, nous prévoyons un groupe infecté SARS-CoV-2 et un groupe contrôle non-infecté, avec au minimum 20 souris par groupe. Ce nombre d'animaux sera suffisant pour une analyse statistique des résultats avec des tests type t-test ou Wilcoxon-Mann-Whitney. Nous estimons utiliser 800 souris dans ce projet, inclus dans 2 procédures expérimentales, de classe modérées.

Raffinement Au cours des expériences, les souris humanisées seront surveillées tous les jours après l'infection par SARS-CoV-2. Les animaux seront traités avec des antibiotiques en post-opératoire, et avec des analgésiques en cas de souffrance. Les points limites seront définis à l'avance afin d'éviter toute souffrance animale, et s'ils sont atteints les animaux seront mis à mort. Leur cage sera enrichie avec un coton dentaire afin qu'ils puissent construire un nid. Les expériences seront réalisées par des expérimentateurs formés.

15609 Le projet Nos données indiquent que la nutrition en période postnatale précoce chez la souris programme la croissance staturo-pondérale en régulant le développement de l'axe somatotrope qui est un axe neuro-endocrinien. Ainsi, une restriction nutritionnelle chez les souriceaux durant la lactation uniquement induit un retard de croissance postnatal permanent.

D'après nos données préliminaires, ce retard serait associé à une modification du statut épigénétique du gène *Srih*, ce qui modulerait son expression de manière permanente. Dans ce protocole, nous souhaitons confirmer cette hypothèse.

Aussi, nous voulons réaliser une étude interventionnelle et évaluer si l'exposition de souris adultes à des agents pharmacologiques connus pour modifier le statut épigénétique est capable d'induire une modification au niveau du promoteur du *Srih* et de modifier son expression génique. La programmation de la croissance par la nutrition postnatale précoce étant plus marquée chez les mâles, seules de souris mâles seront étudiées dans ce protocole.

Les animaux

* Type Souris *mus musculus*

* Nombre Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 180 souris expérimentales pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

La conformité au principe des 3R

* Remplacement Un système vivant est nécessaire pour étudier les acteurs mis en jeu dans le développement de ce projet impliquant de nombreux aspects métaboliques. Il n'est pas possible de recréer *in vitro* la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs cellulaires rentrant en jeu.

* Réduction Nous limitons au maximum le nombre d'animaux par groupe de façon à obtenir des résultats statistiquement fiables. A cause des variabilités inter-animales et intergroupes, un nombre trop restreint d'animaux engendrerait des résultats trop variables et non valides. Compte tenu des données de la littérature (variabilité attendue) et des effets espérés, un test de puissance statistique a été utilisé pour déterminer le nombre minimum d'animaux nécessaire pour cette étude.

* Raffinement Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures ont été mise au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal, en limitant la douleur et le stress (anesthésie, analgésie, etc.). Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation, les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum. Le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification ou de maison de type igloo. Nous nous efforçons à chaque instant de raffiner nos procédures afin de garantir le bien-être des animaux en cours de procédure grâce à une surveillance attentive (point limite) et des soins adaptés (anesthésie, analgésie, etc.).

15610 L'asthme est une maladie très fréquente des voies respiratoires qui touche 300 millions personnes dans le monde. Le terme « d'asthme sévère » s'applique aux patients présentant un asthme dont le contrôle est impossible malgré des traitements inhalés à fortes doses.

Un des besoins non couverts dans l'asthme sévère est la prévention efficace des exacerbations. Ces exacerbations sont des épisodes caractérisés par une majoration des symptômes d'essoufflement, de toux, de respiration sifflante ou d'oppression thoracique et par une diminution de la fonction respiratoire. L'asthme est caractérisé par une hyperréactivité, une inflammation et un remodelage bronchique. Les modifications structurales, que l'on désigne remodelage bronchique inclus notamment une augmentation de la taille du muscle lisse bronchique.

La taille du muscle lisse bronchique a une valeur pronostique car son augmentation est associée à une fonction respiratoire dégradée et à un taux d'exacerbation plus élevé.

Une des caractéristiques majeures du muscle lisse des bronches d'asthmatique est l'excès de prolifération cellulaire dont les mécanismes sont encore inconnus. Le laboratoire a déjà mis en évidence un lien entre la taille du muscle lisse bronchique et l'augmentation de la masse mitochondriale. L'augmentation de la masse mitochondriale est un support pour la prolifération des cellules du muscle lisse bronchique.

Le projet actuel a pour objectif de diminuer chez des souris asthmatiques (modèle pathologique) l'expression d'un gène impliqué dans la production des mitochondries. Le but de la modification de l'activité du gène est d'évaluer les conséquences de la diminution de l'expression de ce gène sur le remodelage bronchique. Les animaux dépourvus du gène subiront un protocole de développement de l'asthme en réalisant différentes administrations d'agents allergènes. L'implication du gène sur le développement de l'asthme sera évaluée en fin de protocole expérimental en effectuant différentes mesures de la fonction respiratoire de l'animal.

Dans notre projet, nous accordons la plus grande importance au respect de la règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer). Les mesures mises en place sont les suivantes

1) Réduire se souciant de réduire le nombre des animaux en expérimentation, nous avons calculé le nombre de souris minimal par groupe pour obtenir des résultats significatifs, 140 souris seront incluses et nous réaliserons de multiples études ex vivo sur différents organes et selon différentes techniques.

2) Raffiner pour diminuer la souffrance et l'angoisse des animaux, des dispositifs sont prévus (anesthésie pour les instillations, analgésie et anesthésie pour les mesures des paramètres respiratoires, raffinement des conditions d'hébergement animaux hébergés en groupe sociaux, milieu enrichie-bâton, copeaux..., accès à la nourriture et à l'eau) et nous avons soigneusement décrit des points limites en relation avec notre protocole (critères de perte de poids, comportement anormal ou difficulté respiratoire).

3) Remplacer En raison de la complexité de la communication intercellulaire menant à la maladie, il n'existe pas de modèle *in vitro* qui permet d'estimer l'évolution du remodelage bronchique dans l'asthme suite au blocage du gène clé de la biogénèse mitochondriale. L'utilisation du modèle d'asthme chronique murin dans nos études nous donnera une meilleure compréhension des phénomènes.

15611 Ces 10 dernières années, de nombreux travaux scientifiques ont montré que les micro-organismes peuplant l'intestin (bactéries, virus, parasites et champignons) sont des acteurs majeurs de la santé humaine et influencent le fonctionnement du cerveau. La composition du microbiote intestinal est

importante dans le contrôle de l'humeur, de la prise alimentaire, de la cognition et de la mémoire. Le microbiote intestinal est également impliqué dans le vieillissement et dans les maladies neurodégénératives telles qu'Alzheimer et Parkinson. La maladie d'Alzheimer, première cause mondiale de démence, étant toujours orpheline de traitement curatif, la modulation de la composition du microbiote intestinal constitue une piste thérapeutique de premier plan.

L'étude des déficits cognitifs et de la mémoire nécessite l'utilisation d'animaux, ceci ne pouvant se faire sur des modèles *in vitro* (Remplacement). Nous utiliserons des souris modèle transgénique de maladie d'Alzheimer, animaux adaptés aux études des phénomènes de mémoire.

Sur la base de nos résultats ayant révélé qu'il existe une dysbiose intestinale chez un modèle murin de la maladie d'Alzheimer, l'objectif principal de ce projet sera de déterminer si cette dysbiose intestinale participe au développement des déficits cognitifs afin d'étudier plus en détail les interactions microbiote/mémoire. Pour cela le transfert adoptif de microbiote intestinal avec ou sans traitement préalable avec des antibiotiques sera réalisé chez les animaux. Pour ce projet, nous utiliserons 1389 souris pour les 5 ans du projet.

Afin de pouvoir évaluer la mémoire, les animaux ne doivent pas être stressés et indissociables des animaux naïfs. Les souris seront hébergées en cages collectives contenant de l'enrichissement environnemental (Raffinement). L'état général de l'animal sera évalué régulièrement et en cas d'altération il y aura une prise en charge en fonction de critères d'évaluations et points limites.

Les tests de mémoire seront réalisés au cours de la procédure de transfert de microbiote et en fin de procédure. Ce suivi longitudinal des performances de mémoire permettra de recueillir des informations multiples avec les animaux inclus dans les procédures (Réduction). Le nombre d'animaux utilisés est le nombre nécessaire et suffisant pour d'obtenir des résultats qui peuvent être interprétés statistiquement, plusieurs prélèvements et analyses se feront sur le même animal (Réduction). Nous utiliserons des mâles et des femelles.

15612 L'efficacité de la majorité des traitements anti-tumoraux réside dans l'élimination de la totalité des cellules tumorales par des effets cytotoxiques directs. Cependant, les thérapies conventionnelles ne remplissent pas toujours ce critère et sont associées à une lourde morbidité. Récemment a été démontrée que la mort cellulaire induite par certains médicaments anti-tumoraux conventionnels (anthracyclines) pouvait générer une réponse immunitaire anti-tumorale participant de façon synergique à l'efficacité thérapeutique. L'utilisation de méthodes de génotypage à haut débit a permis d'identifier un polymorphisme, du gène FPR1 (Formyl Peptide Receptor 1), impliqué dans l'efficacité de la chimiothérapie. La présence de ce polymorphisme a été corrélée à une plus faible survie chez des patients atteints de cancer du sein et colorectal recevant des anthracyclines ou de l'oxaliplatine. Le but de ce projet est de caractériser l'impact de la perte de fonction de ce gène dans le développement de cancer colorectal. Cette question ne peut être abordée qu'*in vivo* car il n'est pas possible d'étudier l'implication du système immunitaire sur le développement du cancer dans des systèmes *in vitro*. Nous souhaiterons effectuer cette étude sur un total de 300 animaux en utilisant des souris C57Bl/6 (n.150) et aussi des souris transgéniques C57Bl/6 Fpr1^{-/-} (n.150), qui sont viables, fertiles, de taille normale et ne présentent pas d'anomalies physiques ou comportementales. Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des expérimentations a été mis au point afin de respecter les exigences de remplacement, réduction et raffinement pour permettre une interprétation fiable des résultats dans le respect du bien-être animal. Notamment, les expérimentations seront regroupées au maximum afin de réduire le nombre d'animaux contrôles. L'étude sera arrêtée si la procédure initiale invalide l'hypothèse de travail. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et adaptées en accord avec le personnel de l'animalerie (les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum; le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification et/ou tunnels en cartons). Les animaux seront observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être. La mise en place d'une grille de suivi strict des points limites permettra d'éviter au maximum le stress et/ou la douleur au cours de l'expérimentation. De plus, le personnel impliqué dans ce projet est qualifié sur le plan technique et formé en continu sur les pratiques d'expérimentation animale. Il assure également une veille scientifique continue, évitant toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature. Notamment, le modèle choisi est très bien do-

cumenté dans la littérature et le protocole solidement établi, permettant ainsi de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés.

15613 Les électrodes en graphène ont d'excellentes propriétés qui leur permettent d'enregistrer des signaux électrophysiologiques tels que les électrorétinogrammes (ERG). Leur utilisation pourrait permettre une meilleure caractérisation des fonctions de la rétine. Le but de ce projet est de voir si l'on peut mesurer une lésion locale avec les électrodes cornéennes en graphène en remplacement de celles en or actuellement utilisées.

Dans ce projet, nous testerons 3 variants d'électrode en graphène. Nous induirons une lésion localisée de la rétine à l'aide d'un laser et nous effectuerons un électrorétinogramme aux animaux avant et après la lésion afin de pouvoir comparer les résultats.

Cette étude sera réalisée sur des rats adultes normaux. Au total 30 rats seront nécessaires à cette étude (10 par variant d'électrode).

Nous avons pris soin dans cette étude du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ».

- Ces expérimentations mettant en jeu la fonctionnalité du tissu rétinien dans son ensemble, l'utilisation de l'animal est indispensable. Il n'y a pas d'alternative par des modèles *in vitro*.

- Le nombre d'animaux a été réduit au minimum pour pouvoir obtenir des résultats statistiquement interprétables et atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus.

- Les rats seront examinés quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Les animaux seront hébergés dans les conditions conformes à la réglementation. Les rongeurs bénéficieront d'une anesthésie générale fixe et d'une anesthésie locale cornéenne si nécessaire. Une signalétique particulière des animaux en expérimentation est utilisée. Elle permet une observation adaptée des animaux pour s'assurer de leur bien-être.

15614 La rétine est le tissu qui tapisse le fond de l'œil et qui est responsable de la transmission des informations lumineuses au cerveau. La rétinopathie diabétique (RD) est une complication du diabète qui constitue la principale cause de perte de vision chez les adultes âgés de 20 à 74 ans. Les souris nourries avec une alimentation riche en graisses (High Fat Diet, HFD) sont souvent utilisées comme modèles pour étudier le diabète de type 2. Certaines anomalies de la structure et de la fonction rétinienne sont similaires à celles de la RD dans ce modèle. Toutefois les mécanismes conduisant à des défauts fonctionnels de la rétine suite à une exposition à un HFD ne sont pas encore bien compris.

L'autophagie est un processus cellulaire de dégradation et de recyclage. Il agit comme un système de nettoyage des cellules en piégeant et dégradant des éléments nuisibles pour leur bon fonctionnement. L'activation du processus d'autophagie et une autophagie fonctionnelle sont généralement associées à une bonne santé et une espérance de vie allongée alors que des dérégulations de l'autophagie sont associées au développement de pathologies incluant des rétinopathies. L'autophagie est sensible aux variations nutritionnelles incluant celles en lipides. Des altérations du processus d'autophagie ont été décrites dans le foie de souris nourries avec un HFD. Ce projet vise à apporter une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires qui contribuent au développement des altérations de la rétine qui se mettent en place suite à la consommation d'une alimentation riche en graisses. Étant donné le rôle essentiel joué par l'autophagie dans la physiologie de la rétine, notre objectif est d'étudier l'impact d'une exposition chronique à un HFD sur l'autophagie rétinienne.

Ce projet de recherche a été élaboré dans le respect des principes bioéthiques de la règle des 3R (remplacer, réduire, raffiner)

- L'utilisation d'animaux vivants est indispensable pour répondre à notre question expérimentale qui vise à étudier l'impact d'un facteur nutritionnel sur l'autophagie rétinienne. Elle ne peut être remplacée par un autre modèle expérimental *in vitro*. En effet, l'effet d'une alimentation riche en graisses sur la rétine n'est pas direct et est la conséquence d'altérations métaboliques qui mettent

en jeu plusieurs organes/tissus (tractus digestif, le foie, le pancréas et la circulation sanguine, ...) ce qui ne peut pas être modélisé *in vitro*. De plus, il n'existe pas à l'heure actuelle de modèle *in vitro* qui permet de reconstituer la complexité cellulaire et la structure hiérarchisée de la rétine.

- Un nombre total de 156 souris sera nécessaire pour réaliser ce projet. Il a été réduit à son minimum (156 souris permettant de réaliser 3 expériences indépendantes nécessitant chacune 2 lots de 26 souris/lot) pour permettre l'obtention de résultats interprétables sur les plans scientifique et statistique.

- Dans un souci de raffinement, au-delà de ceux nécessaires à ce projet, nous conserverons dans les conditions adéquats tout échantillon biologique qui serait susceptible de répondre à d'autres questions scientifiques de notre intérêt dans l'objectif de leur valorisation dans le futur. Enfin, nous nous efforcerons d'apporter une réponse adaptée aux contraintes d'inconfort ou de stress (surveillance quotidienne, enrichissement du milieu). Des anesthésiques seront utilisés lors des examens de la rétine (électrorétinographie et imagerie rétinienne), des examens non douloureux mais nécessitant l'absence de mouvement.

Des points limites ont été déterminés. Ils seront appliqués tout au long de l'étude.

15615 Un protocole de différenciation permettant d'isoler une population de kératinocytes humains obtenus à partir de cellules souches embryonnaires humaines permet de reconstituer un épiderme fonctionnel. Nous pouvons donc envisager la fabrication d'un produit d'ingénierie tissulaire pour un essai clinique de greffe cutanée dans l'indication du traitement de l'ulcère de jambe chez les patients atteints de drépanocytose. Nos collaborateurs ont mené à bien une série de greffe d'épiderme reconstruit leur permettant d'envisager la finalisation de ce projet.

Dans cette demande, l'immunogénicité de ce produit d'ingénierie tissulaire sera évaluée en réalisant des greffes d'épiderme reconstruit sur le dos des souris immunodéficientes NSG dans lesquelles sera reconstitué un système immunitaire permettant d'évaluer cette immunogénicité.

L'étude du rejet des greffons et des populations immunitaires humaines présentes dans le sang périphérique des souris nous permettra de définir l'immunogénicité du produit. Dans le cas d'un rejet, il sera envisagé d'évaluer l'immunogénicité d'autres produits tissulaires modifiés pour que ceux-ci présentent ou sécrètent des molécules inhibant le système immunitaire.

Afin de Réduire le nombre d'animaux et d'avoir une cohérence expérimentale dans cette partie préclinique, seul le produit d'ingénierie tissulaire dépourvu de stratégie anti-rejet sera évalué. En effet, *in vitro* dans des puits de culture, les cellules à l'origine du produit tissulaire ne sont pas immunogènes. Présentées non plus isolément mais au sein d'un tissu, l'immunogénicité peut varier, d'où le recours au modèle animal. Si et seulement si le produit d'ingénierie tissulaire dépourvu de stratégie anti-rejet est rejeté, alors nous testerons, *in vivo*, l'efficacité immunomodulatrice des produits modifiés.

Dans le but du Remplacement, des données préliminaires *in vitro* ont été obtenues mais le devenir de la greffe *in vivo* dans une souris immunodéficiente humanisée est une étape indispensable avant le passage à l'homme. Elle permettra d'apprécier l'immunogénicité de la greffe dans un environnement physiologique (remodelage matriciel, formation des nouveaux vaisseaux, fonctionnalité de l'épiderme formé dans son rôle protecteur).

Enfin, concernant le Raffinement, les chirurgies et les prélèvements sanguins seront réalisés sous anesthésie et un analgésique sera donné en pré et post-opératoire (buprénorphine 0.05mg/kg). En post opératoire, afin d'éviter toute agression pouvant provoquer des blessures sur la greffe, il sera effectué un isolement des souris en environnement enrichi dans des cages sur portoir ventilé avec des nidifications à base de cartons et de tunnels. Après une surveillance post-opératoire et un suivi visuel du greffon, un regroupement des animaux sera réalisé lorsque la greffe sera établie (cicatrisation complète et perte du pansement biologique) et qu'il n'y aura plus de risque de blessure inter-individu. Les animaux seront de nouveau hébergés par 5 dans l'environnement enrichi décrit ci-dessus. Les souris ont accès libre à l'eau et à la nourriture et sont maintenues dans un cycle jour/nuit de 12h/12h.

Au total, 144 animaux (seulement si le produit d'ingénierie tissulaire dépourvu de stratégie anti-rejet est rejeté) sinon 48 souris serviront à évaluer l'immunogénicité de ce produit.

15616 La mitochondrie est en quelque sorte la centrale énergétique de la cellule, et forme un réseau tubulaire extrêmement dynamique. La génétique des maladies mitochondriales est complexe en raison de la double origine génétique des protéines mitochondriales. Celles-ci sont, en effet, codées soit par des gènes nucléaires, soit par les gènes portés par son propre génome (ADN mitochondrial ou ADNmt) présent en milliers de copies dans la cellule et codant pour l'expression de 13 protéines cruciales pour les fonctions mitochondriales. De ce fait, les mutations de l'ADN mitochondrial sont particulièrement critiques et sont responsables de maladies mitochondriales.

Ces maladies mitochondriales ont été associées avec un large spectre de symptômes appartenant aux maladies neurodégénératives incluant désordres du mouvement, cécité, surdité, épilepsie, accidents vasculaires, atteintes cardiaques et autres pathologies. De ce fait, la recherche dans ce domaine est capitale.

Dans le cadre d'un projet de recherche précédent, nous avons réalisé un criblage de drogues à l'aide de ces modèles cellulaires issus de patients avec encéphalopathie mitochondriale, acidose lactique et épisodes déficitaires neurologiques (MELAS, mitochondrial encephalopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes) qui nous ont permis d'évaluer les effets de molécules cibles sur le fonctionnement mitochondrial en particulier avec une augmentation significative de l'activité du complexe I mitochondrial, déficient dans le syndrome MELAS. Parmi ces drogues issues du criblage, le Disulfiram (ou DSF) est apparu comme une molécule agissant pour plusieurs modèles de maladies, avec un mécanisme d'action général affectant le métabolisme du cuivre, critique pour le bon fonctionnement mitochondrial.

Nous avons acquis au sein du laboratoire un modèle de souris ND6 qui reproduit les conséquences d'une mutation homoplasmique de l'ADNmt (la totalité de l'ADNmt cellulaire porte la mutation) responsable d'une dysfonction mitochondriale (souris ND6mut). Il a été montré que cette mutation de l'ADNmt est responsable d'une atteinte cardiaque avec une réduction du complexe I mitochondrial dans le tissu cardiaque estimée à 58% par rapport à une souris contrôle.

Dans ce projet qui a fait l'objet d'une réflexion approfondie au sein du laboratoire, nous voulons, dans un premier temps, explorer l'effet du médicament candidat DSF sur l'activité du complexe I mitochondrial dans le tissu cardiaque mais aussi sur l'amélioration de la fonction cardiaque et musculaire par mesures échocardiographiques et tests d'effort sur tapis roulant respectivement. Nous déterminerons une dose optimale de DSF et traiterons les animaux pendant un mois puis comparerons les paramètres fonctionnels pré- et post-traitement pour déterminer si la drogue a eu un effet bénéfique.

Il y aura 2 génotypes différents utilisés :

-Souris contrôles il s'agira de souris issues d'un croisement entre des mâles ND6mut et des femelles C57BL/6J. La transmission de l'ADNmt étant exclusivement maternelle, toutes les souris des portées seront sauvages pour l'ADNmt.

-Souris ND6mut Elles sont issues d'un croisement entre des mâles C57BL/6J et des femelles ND6mut. La transmission de l'ADNmt étant exclusivement maternelle, toutes les souris des portées seront ND6mut.

Il y aura 3 groupes expérimentaux

- Groupe A, utilisé dans la procédure 1 uniquement, 60 souris
- Groupe B, utilisé dans la procédure 2 uniquement, 120 souris
- Groupe C, utilisé dans les procédures 1, 2, 3, 4 et 5, 120 souris

Le phénotype des souris ND6mut se développant dans les 1ers mois de vie (atteinte cardiaque à 5 mois), nous envisageons de réaliser ces expériences à 5 mois d'âge.

Au total 300 souris seront nécessaires pour ce projet prévu sur une durée de 5 ans. Nous avons calculé ce nombre au plus juste, en gardant à l'esprit la règle des 3R :

- nous ne pouvons pas remplacer ce modèle par un modèle *in vitro*, car les modèles physiopathologiques par définition étudient les conséquences pathologiques de la mutation sur l'ensemble de l'organisme. Les lignées cellulaires ne peuvent reproduire les mécanismes complexes d'adaptation physiologique à cette mutation de l'ADNmt.

- nous réduisons au minimum le nombre d'animaux pour obtenir des résultats exploitables au niveau statistique. Nous utiliserons le test de student et des tests d'Anova deux voies avec post-test de Bonferroni.

La fonction cardiaque des animaux sera évaluée de façon non invasive par échocardiographie. Les animaux seront anesthésiés par une injection intrapéritonéale de kétamine, a la dose de 80mg/Kg puis les souris seront tondues à l'aide d'une tondeuse pour petits rongeurs, afin de mettre du gel pour l'échographie cardiaque. L'échographie cardiaque va durer 30 minutes, et pour ne pas avoir d'hypothermie un tapis chauffant est utilisé avec une sonde rectale et une couverture de survie est placée sur la souris

Les tests seront réalisés au calme par les personnes compétentes et expérimentées afin de réduire le stress des souris. A la fin de l'examen, les souris seront placées dans une cage jusqu'à un réveil complet et dans une couveuse thermostatée a 37°C tout en étant surveillées toutes les 30 minutes. Ensuite, elles seront toutes regroupées dans leurs cages par lot.

Les animaux sont surveillés quotidiennement par le personnel compétent grâce à la grille de score des points limites. Le poids sera suivi 2 fois par semaine.

Une anesthésie à l'isoflurane sera prodiguée avant la dislocation cervicale afin de réduire l'angoisse des animaux

- nous raffinons nos conditions d'expérimentation et d'hébergement pour le bien-être de nos animaux avec le soutien de la structure de bien-être animal (SBEA). Les animaux sont hébergés dans des cages aux normes (au minimum par 2 et au maximum par 5) suivant l'âge et le poids des animaux et les cages sont enrichies par des jouets (copeaux, cabanes, sopalins). Nous raffinons nos expérimentations en utilisant les animaux de chaque groupe pour recueillir plusieurs types de données. Sur chaque animal, l'ensemble des organes et tissus pouvant être recueillis sont prélevés afin d'anticiper les expérimentations futures.

Pour toutes les procédures, les animaux seront observés quotidiennement, et les points limites adaptés suivants seront évalués en détail :

Plaie/ Traumatisme

Comportement/ Mouvement

Aspect général

Evolution pondérale

Un score sera attribué, qui déterminera le traitement suivant :

Score 0 = aucune douleur => pas de traitement

Score 1-2 = douleur légère => injection SC de buprénorphine à 0,1 mg/kg

Score 3-4 = douleur modérée => injection SC de buprénorphine à 1 mg/kg

Score supérieur ou égal à 5 = point limite => entraîne l'arrêt immédiat du protocole et la mise à mort de l'animal

15617 Lors d'une brèche vasculaire, les plaquettes jouent un rôle clef en participant activement à l'arrêt du saignement. Les plaquettes jouent également un rôle majeur en thrombose artérielle et plus récemment, il a été proposé qu'elles participent à la thrombose veineuse.

Lors de l'activation des plaquettes, ces dernières libèrent le contenu de leurs granules et notamment, une quantité importante de sérotonine. La majorité de la sérotonine que l'on trouve dans le sang provient des granules plaquettaires.

L'objectif de ce travail est de caractériser le rôle de la sérotonine libérée par les plaquettes activées en thrombose artérielle et en thrombose veineuse. L'identification du rôle de la sérotonine en thrombose permettrait d'identifier de nouvelles cibles anti-thrombotiques potentielles. Ceci

représenterait une base pour le développement d'agents anti-thrombotiques qui pourraient être utilisés en clinique pour lutter contre les pathologies cardiovasculaires qui représentent la première cause de mortalité et morbidité dans le monde.

Limitation du nombre d'animaux

Remplacement : Le but de ce projet est d'évaluer le rôle de la sérotonine en thrombose. Dans le cadre de cette étude, il est impossible de substituer le modèle expérimental murin à d'autres modèles la thrombose est un processus extrêmement complexe et intégré qui ne peut être reproduit *in vitro*. De plus, les plaquettes sont des cellules anuclées qui ne peuvent être cultivées, empêchant tout modèles reposant sur la culture cellulaire.

Réduction : Le nombre d'animaux utilisés lors de cette étude est réduit au minimum, ce nombre étant fixé à 16 souris/groupe au maximum pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs. Les différents groupes seront comparés soit par

- un test de Mann-Whitney pour comparer 2 groupes,
- un test ANOVA avec un post test de Dunn en cas de groupes multiples.

Raffinement : L'utilisation de modèles d'animaux a été établie en raffinant au maximum les conditions de travail, afin de limiter leur angoisse, stress et douleur lors des manipulations. Pour ce faire, des points limites ont été établis pour les procédures décrites. Ces points limites permettront de soustraire l'animal aux procédures expérimentales permettant de limiter la souffrance et l'inconfort de l'animal.

Pour assurer leur confort, les animaux sont hébergés dans des cages munies de particules de bois et enrichies avec un carré en coton compressé et de frisure de papier, afin de permettre aux animaux de réaliser un nid et de compartimenter leur environnement conformément à leurs besoins comportementaux.

Pour chaque procédure, les animaux sont anesthésiés, maintenus à une température de 38°C par l'utilisation d'une plaque chauffante (tout au long de la procédure) et un traitement approprié contre la douleur leur est administré.

Pendant toutes les expérimentations, les animaux sont surveillés par du personnel entraîné.

Cette étude nécessitera l'utilisation de 820 souris.

15618 Plus d'un tiers des personnes âgées de 65 ans et plus chutent chaque année selon l'OMS, même si la mortalité liée aux chutes reste faible, ces dernières constituent la deuxième cause de décès par traumatisme involontaire, après les décès dus aux accidents de la circulation routière. Les troubles cognitifs, un autre problème de santé publique, touchent une grande partie de la population des personnes âgées plus de 150 millions de personnes seront atteintes de démence dans le monde d'ici 2050 selon l'OMS. Certaines études cliniques ont montré que la consommation de médicaments, en particulier les médicaments anticholinergiques, est un facteur de risque pour l'apparition de chutes et de troubles cognitifs chez les personnes âgées. Il est cependant difficile d'identifier précisément les médicaments les plus à risque d'induire ces effets néfastes chez les personnes âgées en raison de la polypathologie et de la polymédication présentes chez ces patients. De ce fait, l'utilisation d'animaux de laboratoire, chez qui l'administration de médicaments et la présence de pathologies peuvent être contrôlées, peut-être d'un grand intérêt pour identifier les médicaments les plus à risque. Un autre facteur de risque de chute chez les personnes âgées a été mis en évidence par les paradigmes de double tâche qui consistent à marcher et de réaliser simultanément une tâche cognitive secondaire, en raison des liens entre fonction cognitives et motrices. En effet, il a été montré que 80% des personnes âgées à qui l'on demande de marcher tout en parlant et qui ont besoin de s'arrêter de marcher pour continuer à parler sont victimes de chute dans les 5 mois qui suivent. Une de nos hypothèses est que l'augmentation des risques de chute due à la consommation de médicaments à propriété anticholinergique serait médiée par les liens entre la marche et la cognition tels qu'évalués par les paradigmes de double tâche.

Ce projet de recherche à caractère translationnel cherche à mesurer l'effet des médicaments à propriété anticholinergique sur des performances à des tests évaluant séparément la motricité et la

cognition ainsi qu'à des tests de double tâche associant marche et cognition chez l'animal. L'objectif est de mettre en évidence les médicaments les plus à risque de chute et de trouble cognitif et dont la prescription doit être évitée dans la population des personnes âgées. Nous voulons donc élaborer une épreuve de double tâche qui combine de façon simultanée la marche et la mémoire. Ce sera la première fois qu'une telle épreuve sera élaborée chez le rongeur. Au-delà de permettre d'identifier les médicaments ayant un effet néfaste sur la motricité et la cognition, de démontrer un éventuel effet de classe et de caractériser l'effet-dose, cette épreuve, une fois mise en place, pourra servir de nombreuses autres problématiques scientifiques concernant les liens entre cognition et motricité. Dans le but d'identifier les médicaments les plus à risque de chute et de troubles cognitifs, nous prévoyons d'utiliser dans cette phase préliminaire de l'étude, 92 souris au total, dont 20 pour la mise en place des tests comportementaux évaluant la motricité et la cognition et 6 groupes de 12 pour étudier l'effet de molécules à propriétés anticholinergiques sur les performances à ces tests.

L'unique contrainte de cette DAP concerne le protocole de restriction alimentaire, nécessaire à la réalisation des tests comportementaux. Le poids et l'état général des animaux seront donc surveillés quotidiennement. Tout animal présentant un état de mal être sera immédiatement exclu de l'étude (point limites poids inférieur à 85% de son poids projeté, apparence extérieure i.e. qualité du pelage, chromodacryorrhée, ..., comportement d'isolement et de prostration au sein de la cage).

Tout au long de ce projet, les animaux seront maintenus dans des conditions d'hébergement stables, contrôlées et avec un enrichissement du milieu, de manière à assurer un bien-être optimal et répondant aux normes européennes.

Les principes éthiques et les standards de raffinement sont utilisés de la naissance à la mort de l'animal. Le bien-être des animaux sera suivi par du personnel formé, bi-quotidiennement pendant la semaine ouvrée 5j/7 et quotidiennement durant les week-ends et jours fériés. Ainsi, notre demande de projet prend en compte le bien-être animal, les pratiques éthiques et répond à la règle des 3R.

15619 La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) est une maladie du poumon létale sans traitement capable de freiner ou d'inhiber sa progression. La FPI est caractérisée par l'activation de cellules qui communiquent entre elles de façon aberrante, ce qui favorise un phénomène de désorganisation du tissu pulmonaire, d'envahissement de l'espace alvéolaire indispensable aux échanges gazeux et qui conduit à une insuffisance respiratoire fatale. On connaît différents mécanismes cellulaires responsables de la transformation du tissu pulmonaire. Le Transforming Growth Factor (TGF)-b1 est un médiateur qui est surexprimé en cas de fibrose pulmonaire et qui stimule les mécanismes cellulaires menant à la fibrose pulmonaire. Ses effets profibrosants passent par la stimulation de petites molécules présentes dans les cellules pulmonaires, les protéines de choc thermique (HSP). Notre équipe a précédemment montré que plusieurs d'entre elles, notamment HSPB1, HSPB5 et HSP90 sont surexprimées dans les poumons des patients souffrant de fibrose pulmonaire. Ces médiateurs sont présents en quantité importante dans les cellules de poumons fibreux mais peuvent aussi être libérés de ces tissus malades, et aller interagir avec les tissus environnants. Ils se comportent alors comme des messagers extracellulaires. Des données préliminaires obtenues *in vitro* montrent que cette communication, et en particulier celle portée par HSPB1 est aussi impliquée dans le développement de la fibrose pulmonaire.

Nous voulons caractériser les effets d'HSPB1 extracellulaire sur le développement de la fibrose pulmonaire.

Nous utiliserons différents modèles murins de fibrose pulmonaire, ce qui permettra d'explorer les effets des HSPs sur l'ensemble des mécanismes tissulaires du développement de la maladie. Nous utiliserons 2 modèles basés sur l'injection d'un agent anti-cancéreux, la bléomycine chez la souris, ces modèles se différenciant par la voie d'administration, la dose administrée, et la répartition des zones pulmonaires malades.

Le troisième modèle que nous utiliserons consiste à sur-exprimer le TGF-b1 dans le tissu pulmonaire.

Ces 3 modèles de fibrose pulmonaire sont couramment utilisés et reconnus dans la communauté scientifique.

Ce projet nécessitera 1008 souris (C57Bl6/N) et se déroulera sur 3 ans.

Nous utiliserons une stratégie suivant la règle des 3R. Nous remplacerons si possible l'expérimentation sur animaux par des expériences *in vitro*. Mais le tissu pulmonaire est un tissu complexe issu de différentes cellules épithéliales, fibroblastiques, mésothéliales, organisées en tissu et interagissant dans un système dynamique. La fibrose pulmonaire est elle aussi complexe et son développement implique plusieurs processus (inflammation, remodelage tissulaire). Tout ceci rend indispensable de travailler *in vivo* sur l'organe pulmonaire entier pour bien comprendre le rôle des HSPs dans la communication intercellulaire impliquée dans le développement de la fibrose.

Nous raffinerons nos expérimentations pour produire des données les plus pertinentes possibles tout en réduisant l'inconfort des animaux et nous réduirons le nombre d'animaux au minimum tout en permettant de remplir nos objectifs. Une attention particulière sera apportée au bien-être des animaux (densité par cage, enrichissement de milieu). Les souris auront accès à une alimentation enrichie pour limiter la perte de poids et la déshydratation qui caractérisent le modèle. Le modèle de fibrose pulmonaire sera appliqué par du personnel qualifié et entraîné. Afin de réduire la douleur, les animaux seront suivis au moyen d'une échelle d'évaluation de la douleur (cf 3.4.13.). Les points limites fixés nous permettront de décider de la mise à mort ou non des animaux.

15620 Le présent projet concerne le contrôle réglementaire de l'inactivation de la fraction Bordetella Bronchiseptica dans le cadre du contrôle de qualité des vaccins.

Il n'existe pas pour le moment de méthode alternative d'évaluation de l'inactivation de ce produit.

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

- L'enrichissement apporté dans les cages des animaux,
- La surveillance renforcée des animaux
- La définition de points limites adaptés permettant la réduction de la souffrance, le cas échéant.

La procédure est classée en degré de sévérité légère.

Le nombre d'animaux envisagé sera de 150 rongeurs pour l'ensemble du projet.

15621 Les ganglions de la base sont un ensemble de structures cérébrales impliquées dans le contrôle moteur et l'apprentissage des habitudes. L'importance des ganglions de la base est soulignée par la gravité des pathologies qui résultent de leur dysfonctionnement maladie de Parkinson, de Huntington, addictions, troubles obsessionnels compulsifs. Le striatum est une structure des ganglions de la base, qui constitue la principale voie d'entrée. Il est composé de plusieurs sous-populations neuronales, en particulier des interneurons libérant différents neurotransmetteurs, comme le GABA. La déplétion en dopamine observée lors de la maladie de Parkinson est corrélée à une augmentation des activités rythmiques synchrones au sein des ganglions de la base. La réduction des oscillations synchrones étant généralement associée à une amélioration symptomatique des troubles moteurs, il paraît essentiel d'avoir une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques qui génèrent ces activités synchrones afin de mieux traiter la maladie de Parkinson. Notre hypothèse est que les activités synchrones observées dans les ganglions de la base lors de la maladie de Parkinson seraient générées dans le striatum via des changements dans la communication entre les interneurons GABA.

Pour cela, nous réalisons des enregistrements simultanés de paires d'interneurons GABA dans le striatum grâce à la technique d'électrophysiologie *ex vivo* (sur tranches de cerveau), dans des souris normales et des souris rendues "parkinsoniennes" par injection chirurgicale de toxine. Nous utilisons des souris transgéniques qui permettent d'identifier différentes sous-populations d'interneurons GABA grâce à l'expression de protéines fluorescentes spécifiquement dans ces neurones. Les modifications génétiques dans ces lignées ne perturbent pas la physiologie des animaux, et sont complètement "silencieuses" (phénotype "non-dommageable"). Elles servent

uniquement d'outil pour identifier les neurones ciblés. Nos résultats permettront de mieux comprendre la génération des activités synchrones dans le striatum pour éventuellement dévoiler de nouvelles cibles thérapeutiques pour traiter la maladie de Parkinson. Les résultats obtenus serviront à la réalisation d'un modèle mathématique de réseau de neurones striataux permettant ainsi de prédire les mécanismes qui sous-tendent l'apparition de ces oscillations.

Remplacement : il est nécessaire d'utiliser un modèle animal mammifère pour obtenir des résultats potentiellement transposables à l'Homme, car les structures des ganglions de la base ne sont pas présentes, ou sont organisées différemment chez les autres vertébrés (et absentes chez les invertébrés). Parmi les modèles animaux mammifères, la souris est un modèle largement utilisé, permettant notamment l'accès aux lignées transgéniques indispensables pour notre projet. Enfin, la réalisation d'un modèle mathématique sur la base des résultats obtenues sur le modèle animal pourrait constituer une stratégie *in silico* de remplacement des futures études.

Réduction : l'utilisation de souris transgéniques permet de cibler visuellement les neurones d'intérêt (qui ne représentent que 1-2% des neurones du striatum); cela permet de réduire considérablement le nombre d'animaux par rapport à une stratégie non ciblée. Lorsque c'est possible, plusieurs protocoles sont appliqués aux mêmes lots de souris, permettant de réduire là encore le nombre total d'animaux utilisés. Une analyse statistique appropriée est utilisée pour assurer un nombre suffisant d'animaux par groupe pour obtenir un résultat conclusif. D'après les données de la littérature et les standards actuels, nous estimons utiliser au maximum 1100 animaux (220 animaux par an).

Raffinement : les procédures expérimentales sont raffinées à chaque étape les animaux sont hébergés et élevés en condition de milieu enrichi (avec du matériel pour faire un nid) dans une animalerie agréée. La douleur est minimisée lors de la chirurgie (utilisation d'anesthésiques et d'analgésiques appropriés). Le bien-être des animaux est surveillé quotidiennement, et des critères d'arrêt sont définis si une souffrance ne peut pas être soulagée.

15622 Dans le cadre d'un enseignement visant à présenter les approches d'imagerie *in vivo*, et souligner son intérêt dans la démarche de raffinement d'expérimentations en recherche biomédicale et de remplacement et réduction du nombre d'animaux grâce aux techniques d'imagerie, nous proposons aux étudiants une démonstration d'imagerie optique *in vivo* réalisée chez la souris, consistant en un examen en imagerie de bioluminescence et un examen en fluorescence réalisés dans un modèle de tumeur cutanée. L'imagerie sera réalisée à un stade très précoce après l'inoculation des cellules tumorales, stade pour lequel aucune tumeur ne sera visible et mesurable. Les animaux recevront l'administration du réactif permettant l'imagerie de bioluminescence ou de fluorescence par voie intrapéritonéale, et seront soumis à l'examen d'une durée de 5s à 1 min environ. L'examen sera réalisé sous anesthésie gazeuse.

La surveillance quotidienne des animaux permettra de déceler les premiers signaux de stress, de douleurs ou d'inconfort pour l'animal qui seront immédiatement pris en charge. Les animaux seront hébergés par groupe de 5 dans des cages contenant de l'enrichissement de milieux (bâton de bois, coton, maison en cellulose et tube de PP).

Nous prévoyons au total 200 animaux maximum 8 séances de démonstrations par an, à raison de 5 souris par séance, soit un total de 40 animaux par an.

Le nombre d'animaux pourra être revu à la baisse en fonction du nombre de séances proposées.

15623 Les noyaux dopaminergiques, en particulier l'aire tegmentale ventrale (ATV) participent aux fonctions de motivation immédiate et d'apprentissage par renforcement. Ce système de prise de décision est détourné lors de la prise de drogues d'abus, pouvant aboutir à la mise en place d'une addiction. Il est donc essentiel de comprendre comment ces noyaux dopaminergiques sont modulés, et comment cette modulation est détournée par la prise de drogues. En particulier, la nicotine est un agoniste de récepteurs (dits nicotiques) à l'acétylcholine, un modulateur de l'activité et de la plasticité des neurones dopaminergiques.

A partir d'études comportementales et électrophysiologiques chez le rongeur libre de ses mouvements, notre but est donc de comprendre

- comment l'acétylcholine endogène module l'activité des neurones dopaminergiques lors de la prise de décisions.

- comment la nicotine affecte, à court et à long terme, l'activité dopaminergique et altère ainsi les prises de décisions.

Ces études seront réalisées chez 1050 souris C57BL/6j sauvages ou transgéniques, porteuses de mutations des sous unités des récepteurs cholinergiques. Ce nombre correspond au nombre nécessaire pour obtenir des résultats statistiques. Au sein de l'équipe, nous mettrons en place tous les efforts nécessaires pour réduire ce nombre, en arrêtant l'expérimentation quand un effet statistique est trouvé, et en raffinant les expériences en suivant les développements techniques du domaine comme l'utilisation de système d'enregistrement permettant la stimulation électrique et l'enregistrement simultanément des zones d'intérêts. Nous réutiliserons les animaux des différents protocoles quand c'est possible. Nous utilisons également des modèles mathématiques en amont de l'expérience pour indiquer les mesures d'intérêt ce qui permet de remplacer des étapes de mises au point.

Nous procéderons à l'analyse de l'activité comportementale et électrophysiologique dans plusieurs séries de tests impliquant des processus de prise de décision, de façon successive, réduisant ainsi le nombre d'animaux nécessaire.

L'étude des relations entre le comportement et l'activité dopaminergique ne peut être réalisée que sur un animal, non anesthésié, dans un état de vigilance et comportemental précis. Un modèle expérimental de remplacement ne peut être envisageable.

Par l'utilisation d'un système de micro-descendeur rendant possible le mouvement des électrodes d'enregistrements directement sur l'animal permet, après chaque série d'enregistrement d'une population neuronale, de pouvoir descendre les électrodes et ainsi d'enregistrer une nouvelle population. Par cette technique, chaque animal pourra passer successivement dans l'ensemble des protocoles comportementaux et pharmacologiques de manière répétée. Chaque animal est pesé avant l'opération ainsi que chaque jour post opératoire lors de soin éventuel afin d'assurer un suivi sanitaire complet pendant toute la période d'acclimatation qui se poursuivra pendant une quinzième de jours mais qui peut se poursuivre jusqu'à récupération d'un état de santé satisfaisant. Un délai d'une semaine est imposé entre chaque injection. L'hébergement se fait en cage regroupant de 2 à 4 animaux en fonction de l'agressivité de chacun, un enrichissement cellulosique est ajouté à chaque cage permettant aux animaux la confection d'un nid végétal. Cet apport est renouvelé à chaque change de cage (2 fois par mois).

15624 I. Contexte scientifique

Notre information génétique est constituée de molécules d'ADN, logées dans un compartiment appelé noyau, au sein de chacune de nos cellules. Cet ADN est d'une longueur très impressionnante, environ 2 mètres, pourtant, nos cellules ont des tailles environ un à dix millions de fois plus petites! En fait l'ADN est compacté et organisé dans le noyau par des protéines spécialisées et cette organisation est essentielle afin d'utiliser correctement l'information qui y est logée. Dans ce contexte, nous sommes particulièrement intéressés par l'étude des rôles spécifiques des facteurs qui contribuent à ces processus. De manière frappante, plusieurs études récentes, rendues possibles grâce aux nouvelles technologies de séquençage, ont identifié des erreurs (mutations) fréquentes de ces facteurs dans des cancers tissu-spécifiques. Parmi eux, on peut citer les cancers du cerveau chez l'enfant, appelés glioblastomes, qui sont très agressifs et sans traitement efficace pour le moment. Comme attendu, les mutations de ces facteurs sont associées à une désorganisation de la compaction de l'ADN et une utilisation incorrecte de l'information génétique dans les cellules cancéreuses.

II. Objectifs du projet

Le projet vise à analyser les rôles spécifiques de protéines impliqués dans l'organisation et la « lecture » des molécules d'ADN. A cette fin, différents types de cellules seront analysés chez la

souris, au cours du développement et chez l'animal adulte et dans un contexte sensibilisé au développement tumoral.

III. Avantages du projet

La souris a été choisie comme modèle *in vivo* pour son génome bien caractérisé et la possibilité de générer de nouvelles lignées génétiquement modifiées. Seul le modèle animal permet de procurer un système physiologique donnant l'accès à des cellules différentes (en division ou pas) et âges différentes (embryonnaire, périnatale ou adulte). La souris constitue un outil de recherche fondamental unique pour comprendre les mécanismes mis en jeu lors du développement normal et pathologique. De plus, la disponibilité d'un grand nombre d'outils génétiques (lignées murines) permet une analyse fine des réseaux biologiques mis en jeu.

IV. Dommages escomptés

Différents phénotypes (stérilité, létalité précoce, développement de tumeurs), actuellement inconnus, sont envisageables et pourraient être relevés lors de la surveillance quotidienne et les analyses des animaux.

V. Respect des 3R

Remplacer il existe plusieurs études, visant à comprendre la fonction des protéines que nous proposons d'étudier, mais elles ont été réalisées *in vitro* ou dans des lignées cellulaires. Ces approches aident à notre compréhension de l'importance d'organiser et orchestrer l'utilisation de l'information génétique dans nos cellules. Cependant, la limite des approches utilisant des lignées cellulaires est qu'elles ne permettent pas de prendre en compte le contexte tissu-spécifique et sont basées parfois sur des cellules ayant un génome modifié qui n'est pas représentatif des contextes développementaux ou tumoraux spécifiques. Une partie de l'étude sera basée sur la dérivation et l'analyse de cellules primaires en culture, porteuses de modifications génétiques bien contrôlées, afin de remplacer et réduire le nombre d'animaux utilisés.

Réduire Nous proposons d'utiliser un maximum de 1302 souris sur une durée de 5 ans. Ce nombre est défini d'après les travaux de consortiums internationaux (IMPreSS). Ainsi le nombre d'animaux est réduit tout en permettant des conditions d'analyse rigoureuse et fiable. L'utilisation d'approches alternatives telles que la dérivation de cultures de cellules primaires et d'organoïdes est également envisagée afin de remplacer et réduire le nombre d'animaux utilisés.

Raffiner En accord avec les recommandations internationales dans le domaine de la cancérologie, les animaux seront suivis quotidiennement. Leur état sera évalué selon une grille de scores qui orientera la prise en charge, ceci afin d'assurer une expérimentation dans le respect du bien-être animal.

- 15625** Les troubles du mouvement sont des pathologies neuromusculaires, souvent chroniques, qui handicapent durablement les patients et ont donc un impact sociétal important. La dystonie, par exemple, est un trouble qui se caractérise par des contractions musculaires involontaires entraînant des mouvements répétitifs. La spasticité musculaire, quant à elle, est considérée comme une sur-contraction inhabituelle et involontaire du ou des muscles. Ce trouble du système nerveux central résulte en une crispation et une rigidité accrue du muscle touché. Le traitement de ces pathologies neuromusculaires implique généralement la prescription de traitements administrés oralement le baclofène, les benzodiazépines, le dantrolène... Ces traitements systémiques comportent cependant tous des effets secondaires conséquents (sommolence, nausée, fatigue). Une solution pour diminuer ces effets secondaires consiste à administrer le baclofène via une pompe intrathécale cette approche est toutefois invasive. Alternativement, l'injection intramusculaire de certains produits directement dans le muscle affecté peut soulager ces pathologies le phénol ou la toxine botulique. Cette approche présente de clairs avantages devant celles présentées précédemment, notamment concernant les effets secondaires. Toutefois, cette approche peut encore être optimisée les patients et soignants attendent des myorelaxants offrant encore moins d'effets secondaires, capables d'être efficaces rapidement après l'injection, et dont les effets seraient durables. L'objectif de notre projet global est de mettre en évidence l'effet bénéfique de l'utilisation locale d'un produit myorelaxant à effet rapide et durable, sur la contraction musculaire pour les patients souffrant de

troubles du mouvement comme la dystonie et la spasticité. Nous démontrerons les bénéfices de nos produits face aux produits de référence utilisés en clinique.

Il n'existe à ce jour pas de test *in vitro* qui permette de tester la pharmacologie locale de ces molécules (cinétique de l'effet myorelaxant) qui est l'élément clé de leur valeur clinique, ce qui justifie donc notre étude sur modèle animal. Nous avons au cours d'une étude pilote (comportant des petits groupes d'animaux) précédente obtenu des résultats prometteurs, et donc identifié un premier produit candidat avec une activité myorelaxante rapide et durable chez le rat. Nous avons utilisé durant ce pilote le test du « Digit Abduction Score » (DAS), un test reconnu comme pertinent pour mesurer l'activité myorelaxante d'un produit (Broide, et al., 2013)

Cette étude a pour objectifs i) de confirmer nos résultats dans le modèle animal rat déjà utilisé, avec des groupes d'animaux plus conséquents pour valider la robustesse des résultats, ii) puis de les confirmer dans un second modèle animal la souris et iii) d'optimiser les paramètres d'utilisation du produit (en particulier les doses).

Concernant l'application des 3R, le remplacement ne peut pas être assuré dans cette étape du programme de travail, car la pertinence des modèles cellulaires de coculture est aujourd'hui encore débattue, et de tels modèles ne prennent de toute façon pas en compte le paramètre de diffusion (qui est essentiel lorsqu'on s'intéresse au profil pharmacodynamique des composés). Le test DAS nous permet au contraire de mesurer l'activité myorelaxante tout en prenant en compte ce paramètre.

Pour la réduction, l'étude précédemment réalisée nous a permis de retravailler le design des études afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs nous souhaitons toutefois encore optimiser ce paramètre au cours de ce projet pour diminuer le nombre total d'animaux permettant d'arriver à une conclusion. Par ailleurs ce projet permettra d'identifier la dose optimale de la molécule testée sur un petit nombre d'animaux par groupe. Seule cette dose optimale sera ensuite confirmée sur un plus grand nombre d'animaux.

Concernant le raffinement, les animaux seront hébergés en groupe (2 pour les rats et 5 pour les souris) avec enrichissement du milieu, et surveillés quotidiennement. Notre étude précédente nous a permis un raffinement du modèle DAS chez le rat l'injection intramusculaire dans le membre inférieur est réalisée sous contention par un expérimentateur entraîné, et les mesures de DAS sont brèves, indolores et peu stressantes pour les animaux. Chez la souris, compte-tenu de sa petite taille et afin de ne pas réaliser une contention stressante pour l'animal, l'anesthésie générale sera utilisée pour la réalisation de l'injection intramusculaire. Et au cours de cette étude, nous souhaitons continuer à limiter au maximum le stress des animaux.

En conclusion, cette étude, prévue sur 3 ans, nous permettra donc de quantifier de manière robuste la valeur ajoutée de notre produit, en utilisant au maximum 216 rats (souche Sprague-Dawley, femelles) et 300 souris (souche CD-1, femelles).

Ces données serviront de base à la conception d'un essai clinique chez l'homme.

15626 Le chondrosarcome, également appelé tumeur maligne du cartilage, est une tumeur à la fois difficile à diagnostiquer et à traiter puisqu'elle est considérée comme chimio et radio résistante. En effet, à l'heure actuelle, il n'existe pas de méthode de diagnostic spécifique de cette pathologie et la matrice extracellulaire tumorale très dense et peu vascularisée limite la pénétration de nombreuses molécules de chimiothérapie et l'action de la radiothérapie. Le seul traitement utilisé est donc la chirurgie possédant, en cas de rechute et dans les formes les plus graves, un taux de survie à 10 ans de seulement 21%. Néanmoins, certains travaux de recherche ont permis de mettre en évidence l'intérêt d'une molécule pour traiter ce type de cancer : l'acide zolédronique. Cette molécule possède des propriétés anti-résorptives empêchant ainsi la tumeur de dégrader l'os. Ainsi, l'objectif de ce travail est de caractériser en imagerie multimodale notre modèle d'étude du chondrosarcome puis de valider l'intérêt de l'acide zolédronique pour le traitement du chondrosarcome en suivant cette réponse de façon longitudinale en imagerie.

Pour cette étude, réalisée chez le rat, les animaux seront implantés avec un fragment de tumeur au niveau du tibia. Afin de prévenir toute douleur, la chirurgie sera réalisée sous anesthésie gazeuse

et les animaux recevront une dose d'antalgique avant et 24h et 48h après la chirurgie. Au cours de la croissance tumorale, les animaux seront ensuite suivis en imagerie nucléaire et en imagerie par résonance magnétique avec ou en l'absence de traitement à l'acide zoldronique. Les imageries seront réalisées sous anesthésie gazeuse afin de limiter le stress pour l'animal. L'intérêt de l'imagerie multimodale utilisée dans ce protocole est de pouvoir suivre de façon non invasive les modifications du métabolisme tumoral en réponse au traitement sur le même animal, limitant ainsi le recours à un nombre d'animaux trop élevé.

Ainsi pour ce projet le nombre d'animaux, optimisé conformément à la règle des 3R, est de 80 rats (+ 20 euthanasiés le 16/03/20 crise sanitaire COVID-19) sur 5 ans soit un total de 100 animaux. Ce nombre a été calculé afin de garantir une valeur statistique à l'étude menée. En effet, de nombreuses études *in vitro* réalisées ont permis de remplacer l'utilisation des animaux notamment pour tester la cytotoxicité de l'acide zolédronique sur les cellules de chondrosarcome. Cependant, ces études sur cellules ne peuvent pas se substituer aux études sur un organisme entier afin d'évaluer les effets potentiellement indésirables sur d'autres organes d'une chimiothérapie. Au cours de ce projet, le nombre d'animaux nécessaire est réduit au maximum en sélectionnant uniquement les expérimentations essentielles. L'utilisation et la validation de nouvelles techniques d'imageries permettent de réduire le nombre d'animaux. Ainsi chaque animal est son propre contrôle et pourra être suivi dans le temps. Ces techniques d'imageries permettent de réaliser des caractérisations métaboliques *in vivo* de manière non invasives. La surveillance quotidienne des animaux permettra de déceler les premiers signaux de stress, de douleurs ou d'inconfort pour l'animal qui pourront être améliorés par l'administration d'antalgiques avant l'atteinte des points limites définis. Les conditions d'hébergement seront optimisées (portoirs ventilés, température, hygrométrie, luminosité, densité animale, enrichissement de milieu avec coton pour la nidification et tube).

15627 Ce projet concerne l'étude d'une population de cellules immunitaires particulières les macrophages résidents. Ces cellules assurent la protection de l'organisme grâce à leur capacité à phagocyter, c'est à dire à ingérer différentes cibles biologiques, en particuliers des agents infectieux (virus, bactéries, parasites) mais aussi certaines cellules devenues inutiles (cellules vieillissantes ou endommagées) ou dangereuses (cellules cancéreuses). Ils possèdent aussi la capacité de sécréter différentes substances biologiques permettant d'attirer d'autres cellules immunitaires (cytokines) ou de modifier leur environnement tissulaire (enzyme de digestion de la matrice extracellulaire). Toutes ces propriétés en font des agents majeurs dans la réaction inflammatoire, en cas d'infection et lors de la cicatrisation/régénération des tissus lésés. Les macrophages résidents se distinguent des macrophages « classiques » par le fait qu'ils ne sont pas générés par les cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse. Ils sont produits au cours du développement embryonnaire. Ensuite, ils migrent pour coloniser les différents organes du fœtus (cerveau, peau, poumons, foie, rein, etc) où ils persistent après la naissance chez l'individu adulte (d'où le qualificatif de « résidents »). Au cours de la vie adulte, ils ne sont remplacés que partiellement par ceux générés par la moelle osseuse. Ceux du cerveau par exemple demeurent presque exclusivement d'origine embryonnaire. Du fait de cette absence de renouvellement il est important de comprendre comment ils réagissent à des dommages de l'ADN et plus particulièrement quel est leur devenir en cas de défaut majeur des mécanismes de réparation des dommages à l'ADN. Assiste-t-on alors à leur dégénérescence accélérée comme d'autres types cellulaires (neurones) dans ces contextes pathologiques.

L'objectif général du présent projet est l'étude des macrophages résidents dans les phénomènes physiopathologiques liés à la réparation des dommages de l'ADN. Bien qu'étant un projet de recherche très fondamental, les connaissances qu'il apportera pourront bénéficier, à terme, à des domaines plus appliqués concernant la défense immunitaire, le cancer et les processus de vieillissement accéléré. Aucun modèle *in vitro* ne permet l'étude directe et fidèle du système immunitaire. En particulier, les essais *in vitro* sont incapables de reproduire toute la complexité des facteurs impliqués dans les phénomènes de réaction immunitaire ou de vieillissement. De même, la différenciation des macrophages à partir de leurs précurseurs embryonnaires est influencée par des facteurs de la niche foetale et ne peut pas être reproduite *in vitro* sans artefact. Il n'est donc

malheureusement pas possible de satisfaire au principe de Remplacement du model expérimental murin *in vivo*. Nous prévoyons d'utiliser 666 animaux répartis dans les différents génotypes afin d'atteindre la puissance statistique théorique. Afin de respecter le principe de Réduction, nous diminuerons le nombre d'animaux en cours d'expérience si la puissance statistique est atteinte.

Ce projet comporte deux procédures

1) Nous analyserons les conséquences d'une inflammation transitoire ou prolongée sur les macrophages résidents dans un contexte de défaut de réparation de l'ADN (souris KO pour XLF et ATM). Des souris de 6-8 semaines seront injectées (I.P.) toutes les 48h pendant 2 semaines (transitoire) ou 1 mois (prolongée) avec des molécules qui activent les macrophages résidents. Les animaux seront sacrifiés pour analyse 48h/2semaines (inflammation transitoire) ou 48h/2semaines/12semaines (inflammation prolongée) après la dernière injection. Cette procédure implique 576 animaux.

2) Nous analyserons la fonction des macrophages résidents chez des animaux jeunes (6-8 semaines) et vieux (24 mois) dans un contexte de défaut de réparation de l'ADN (KO XLF). Les animaux ATM KO ne sont pas utilisés ici pour éviter le phénotype tumoral des souris ATM KO âgées. La fonction de phagocytose des macrophages sera analysée après injection (bolus I.V. de 50µl) de billes de latex ou de bio particules de bactéries fluorescentes. Les animaux seront mis à mort pour analyse 1h et 24h après l'injection. Cette procédure implique 90 animaux.

Aucun des animaux utilisés ne présente de phénotype dommageable aux âges utilisés. Nous n'anticipons pas de dommages ou douleurs particuliers aux souris durant ces deux procédures, notamment lors des injections de billes de latex et de bio-particules (procédure 2). Néanmoins, l'apparition de lésions (ulcération, infection) aux sites d'injection constitue un point limite entraînant la mise à mort de l'animal. Par ailleurs, Nous avons établi une grille de score pour l'évaluation journalière des animaux et la définition de points limites entraînant la mise à mort de l'animal en cours d'expérience. Enfin, pour satisfaire au principe de Raffinement, les animaux d'un même groupe expérimental seront hébergés ensemble avec une litière appropriée et des matériaux de nidification pour assurer un raffinement optimal.

15628 Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) regroupent la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique. Elle se caractérise par une inflammation du tube digestif et du rectum pour la rectocolite hémorragique alors que la maladie de Crohn peut atteindre la totalité du tube digestif. Ces pathologies touchent environ 250 000 personnes en France et 3 000 000 dans le monde. Les MICI sont associées à une augmentation du risque d'accidents thromboemboliques veineux et artériels. Le projet cible le nouveau concept d'immunothrombose (IT), initialement défini comme un système de défense contre l'entrée d'agents pathogènes dans la circulation, car lorsqu'il est hyperactivé (IT dérégulée) il pourrait conduire à un état prothrombotique et in fine à un développement de la fibrose intestinale qui sont deux complications majeures des MICI. Les traitements actuels des MICI par des anti-inflammatoires agissent sur l'inflammation mais pas sur le versant « thrombotique » et donc pas sur l'IT. De nouvelles molécules pour normaliser l'IT dérégulée seraient complémentaires (ou alternatives) des traitements anti-inflammatoires. Nous nous intéresserons au rôle de la paroi vasculaire dans la survenue des événements thromboemboliques et l'inflammation intestinale des MICI. Dans le cadre du respect de la règle des 3R Remplacement Il n'existe pas d'alternative *in vitro* pour étudier les mécanismes des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et induire des colites. Réduction Afin de limiter le nombre d'animaux, plusieurs types de mesures seront effectuées sur un même animal. Raffinement Toutes les expériences invasives se feront sous anesthésie gazeuse (isoflurane en traitant la douleur si nécessaire par injection sous-cutané de buprénorphine). Il y aura 4 groupes, animaux contrôles et animaux mutés chacun subdivisé en deux groupes sans ou avec colite aigue. Ainsi 98 souris seront nécessaires pour cette étude afin d'obtenir une puissance statistique suffisante tout en réduisant au maximum le nombre d'animaux. Raffinement L'induction de la colite sera faite dans les cages de stabulation des souris, qui constituent un environnement sécurisant pour l'animal et les endoscopies se feront sous anesthésie générale. Une procédure d'estimation et suppression de la douleur est mise en place. Les points limites sont fixés selon un score défini au préalable et qui tient compte

des signes éventuels de mal-être tels que l'isolement ou l'immobilité, les yeux fermés, le dos voûté, les poils hérissés, et plus particulièrement la perte de poids la déshydratation. Au total, il y aura 3 procédures incluant l'induction de la colite, une endoscopie pour évaluer la gravité du phénotype, et un prélèvement sanguin pour les études *in vitro*. Ces procédures seront effectuées sur nos 4 groupes de souris C57BL/6 vSMKO +/- C57BL/6 vSMKO +/- avec colite aigue DSS 3% C57BL/6 vSMKO -/- contrôle C57BL/6 vSMKO -/- avec colite aigue DSS 3%. En fin de protocole, les animaux seront mis à mort et des organes prélevés pour permettre des analyses histologiques et biochimiques.

15629 L'ischémie de la rétine consiste en un manque d'oxygène et de nutriments qui aboutit si elle persiste à la mort des neurones rétiniens qui nous permettent de voir, et une perte de vision. Ce phénomène se produit dans de nombreuses pathologies oculaires parmi lesquelles les occlusions vasculaires rétiniennes qui sont l'équivalent de l'infarctus dans la rétine, ou encore la rétinopathie diabétique au cours de laquelle les vaisseaux, lésés, sont obstrués ou occlus. En aval de l'occlusion, la rétine, insuffisamment irriguée, souffre par manque d'oxygène. Deux phénomènes sont responsables de perte de vision le ralentissement circulatoire et l'œdème rétinien ou maculaire. Dans tous les cas, ces pertes de vision sont handicapantes et parfois irréversibles.

Afin d'en comprendre les mécanismes et mettre au point des stratégies préventives et thérapeutiques, l'occlusion veineuse peut être expérimentalement induite par deux méthodes que nous souhaitons développer dans ce projet

- La photocoagulation laser entraîne des lésions vasculaires similaires à celles observées chez l'homme.
- Les venins de serpent sont une source de molécules biochimiquement actives qui ont suscité l'intérêt en vue d'une application pharmacologique. Au Brésil, l'espèce *Bothrops leucurus* (*B. leucurus*), responsable des taux les plus élevés d'empoisonnements par morsure de serpent, inocule des molécules qui contiennent une grande variété de protéines et de peptides biologiquement actifs qui modifient les processus physiologiques et biochimiques normaux, et qui constituent une cible du développement de nouveaux médicaments. La purification et la caractérisation de ces substances ont mis évidence le ciblage du système vasculaire, en particulier des mécanismes qui coordonnent la cascade de coagulation et des fonctions plaquettaires dans le sang.

Ainsi, la compréhension des mécanismes impliqués dans les processus de dégénérescence vasculaire et de dégénérescence consécutive des neurones rétiniens, est d'une importance fondamentale pour évaluer et surveiller l'évolution des maladies des vaisseaux de la rétine, ainsi que pour essayer de les traiter.

Nous voulons développer ici deux modèles de lésions vasculaires dans la rétine pouvant entraîner la mort des photorécepteurs rétiniens. Ces deux modèles nous serviront plus tard à tester les molécules thérapeutiques que nous avons identifiées *in vitro* et *in vivo* dans d'autres modèles, et qui semblent protéger l'intégrité des vaisseaux rétiniens et la fonction visuelle.

Dans ce contexte, l'injection, chez des rats, d'une substance extraite du venin de serpent, apparaît comme une alternative pour développer un modèle animal de dégénérescence dans lequel il sera possible d'évaluer l'activité et l'efficacité de traitements potentiels pour des maladies oculaires qui se soignent encore très mal.

Compte tenu de ce qui précède, les objectifs de cette étude sont les suivants

- mettre au point deux modèles animaux reproductibles d'œdème, d'ischémie et d'altération ou occlusion vasculaire rétiniens chez le rat 1-par injection d'une molécule active 2-par impacts laser
- décrire en détails par angiographie en fluorescence et par tomographie par cohérence optique (OCT) les conséquences oculaires aux niveaux tissulaire et moléculaire, chez des rats ayant reçu soit une injection de la molécule active, soit des impacts laser.

L'espèce animale utilisée est le rat car c'est dans cette espèce que nous avons déjà des connaissances et des images de référence sur le sujet, de races Wistar, Long Evans et Brown

Norway (dont la pigmentation ou l'absence de pigmentation permettent de réaliser des examens précis, et dont les réactions inflammatoires sont différentes). Le nombre total d'animaux nécessaires est de 432 rats Wistar, 432 rats Long Evans, et 144 rats Brown Norway, soit 1008 en tout. L'utilisation de mâles permet de s'affranchir de l'effet confondant des variations hormonales.

Ce projet respecte la règle des 3 R

- Remplacer : une partie de ce projet consiste à évaluer et décrire l'effet de la molécule active sur l'épithélium pigmentaire rétinien. Cette partie, qui précèdera La partie *in vivo* chez Le rat, se fera sur des cultures cellulaires d'épithélium rétinien. Cette étape nous permettra d'approcher la dose à injecter *in vivo*.

- Réduire : sur chaque animal, nous réaliserons une analyse *in vivo* et une analyse *ex vivo*, afin d'utiliser le moins d'animaux possible. Nous utiliserons des tests statistiques non paramétriques adaptés aux petits nombres.

- Raffiner : tous les examens et interventions sur les animaux se feront sous anesthésie générale et locale limitant ainsi tout stress et douleur, et limitant les mouvements des animaux. De plus, les examens que nous réaliserons ainsi que les impacts laser sont pratiqués couramment chez l'homme soit sous anesthésie locale (Injection intraoculaire) soit sans anesthésie (Impacts laser, tomographie en cohérence optique et angiographie en fluorescence) car ils sont très peu ou pas douloureux. Les animaux sont hébergés en conditions enrichies (tunnels en carton) avec respect du rythme circadian sous surveillance quotidienne. Par souci éthique, un seul oeil par rat sera injecté ou laserisé.

15630 Les maladies neurologiques telles que l'épilepsie, la maladie d'Alzheimer ou les migraines pourraient être induites par des ondes lentes de dépolarisation corticale (CSD). Cette vague de dépolarisation des neurones et des cellules gliales qui se propage à travers le cortex cérébral serait responsable de ces pathologies.

Dans ce projet, nous envisageons d'étudier les mécanismes physiologiques de ces ondes en les induisant à l'aide de molécules pharmaceutiques. Ces molécules seront injectées dans le cortex cérébral de rats adultes normaux sous anesthésie générale et les observations seront réalisées à l'aide d'un implant cortical et d'un échographe à ultrasons. Au total 20 rats seront nécessaires à cette étude.

Remplacement L'utilisation du modèle animal est indispensable pour cette étude. L'activité cérébrale ne peut être mesurée/visualisée par des tests *in vitro*.

Réduction Le nombre d'animaux utilisé est le minimum requis pour atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ».

Raffinement Les rats seront examinés quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Les animaux sont hébergés dans les conditions conformes à la réglementation. Les rongeurs seront sous anesthésie générale et leur température corporelle maintenue durant l'ensemble des procédures expérimentales de ce projet. La douleur sera prévenue par administration d'opioïdes en pré-opératoire.

15631 Nous travaillons sur la division cellulaire dans l'épiderme. Comprendre comment se déroule la division cellulaire dans un épithélium est crucial car les défauts de division cellulaire peuvent conduire à certaines pathologies comme le cancer. Pour cela, nous étudions *in vivo* la régulation de protéines clés de la division cellulaire.

Pour réaliser ce projet, nous appliquons la règle des 3R (Remplacement, Réduction et Raffinement)

Remplacement : Nous utilisons la larve de *Xenopus laevis* comme modèle d'étude de la division des cellules épithéliales de vertébrés. L'épiderme de la larve de Xénope est externe et donc facilement modifiable et observable *in vivo*. De plus, au stade où nous menons nos études (quelques heures après la fécondation), les divisions cellulaires dans l'épithélium sont très fréquentes. Il n'existe pas de modèle *in vitro*, de culture cellulaire, permettant d'étudier la division

de cellules épidermales. Des études sur ce sujet sont menées chez l'insecte mais l'organisation des contacts entre cellules est différente. De plus, certains gènes qui nous intéressent n'existent pas chez l'insecte. Il est crucial de disposer de ce modèle larvaire.

Réduction : Pour notre projet nous utilisons uniquement des larves très précoces. A ces stades de développement elles n'ont pas encore différencié de système nerveux. Nous travaillons sur plusieurs centaines de larves qui sont obtenues par fécondation *in vitro*. A cette fin environ 25 mâles adultes seront sacrifiés chaque année. Nous optimisons au maximum l'utilisation de ces mâles en regroupant le même jour les expériences de plusieurs expérimentateurs. Ainsi, nous limitons au possible le sacrifice des *Xenopus* mâles. Les oeufs sont obtenus par l'induction de la ponte. Un maximum de 100 femelles *Xenopus* seront utilisées. Elles ne sont pas sacrifiées mais sont réutilisées pendant plusieurs années après une période de repos de 2 mois suivant la ponte.

Raffinement : les conditions de manipulation avant, pendant et après les expériences sont maintenues optimales de façon à respecter le bien-être des animaux. Chaque expérience est planifiée et maximisée de façon à obtenir le maximum de résultat pour chaque fécondation *in vitro*.

15632 Les maladies neurodégénératives dont la maladie d'Alzheimer, d'Huntington et les ataxies spinocérébelleuses (SCA) sont une préoccupation croissante en santé publique. Malgré d'importants efforts de recherche, il n'existe encore aucun traitement capable de combattre de façon efficace la progression de ces maladies.

Des nouvelles approches thérapeutiques sont essentielles pour progresser dans la prise en charge de patients. Parmi ces nouvelles approches thérapeutiques prometteuses se trouvent la thérapie génique. Elle utilise l'ADN pour soigner ou prévenir de la maladie. Selon la pathologie, cet objectif peut être atteint en délivrant aux cellules un gène à action thérapeutique (transgène) qui surexprime la protéine déficiente dans la maladie. Ces acides nucléiques sont le plus souvent transportés dans les cellules grâce à un vecteur viral. La preuve de concept de cette stratégie dans des modèles murins pour ces maladies neurodégénératives a déjà été montrée.

L'objectif de ce projet est donc d'évaluer la faisabilité et l'efficacité de l'administration par thérapie génique à l'aide d'un vecteur adéno-associé (AAV), dans le but de choisir le sérotype viral ainsi que la voie et le lieu d'administration les plus appropriés pour cibler la région d'intérêt.

Le choix de l'espèce est basé sur son homologie avec l'homme, au niveau des plans anatomiques et fonctionnels du système nerveux central (SNC) et du point de vue immunitaire (tolérance semblable).

3R Il nous est impossible de remplacer l'animal par une simulation informatique ou d'autres méthodes expérimentales car le cerveau du primate non humain (NHP) est un organe plus complexe par rapport aux rongeurs et plus proche du cerveau humain (taille et anatomie). Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. L'application de critères d'arrêts standards en élevage/utilisation, et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe certifient le bien-être des animaux. De plus, en cas d'observation de la moindre douleur, les animaux recevront un traitement analgésique et anti-inflammatoire, et si cette douleur devait persister, les animaux seraient euthanasiés pour éviter toute souffrance.

Tous les animaux seront nés et élevés en captivité dans des élevages agréés, une période d'acclimatation de 2 semaines est observée à l'arrivée des animaux. Le présent projet limitera le nombre d'animaux au strict minimum 20 PNH, et veillera à ce qu'ils ne souffrent ni des procédures d'administration des vecteurs AAV, ni de la présence d'AAVs dans leurs organes. Des examens cliniques journaliers et l'application de critères d'arrêt de protocole permettront de veiller au bien-être des animaux.

Les procédures chirurgicales seront effectuées par un groupe composé de biologistes/ingénieurs spécialistes de la neurochirurgie et 2 neurochirurgiens. Cela garantira la faisabilité/qualité des gestes chirurgicaux, leur efficacité et la maîtrise de l'anesthésie et de l'analgésie. L'utilisation de méthodes non-invasives, en particulier d'imagerie *in vivo* (IRM), pour repérer les sites d'injection avant la chirurgie et pour vérifier si le produit thérapeutique est bien toléré, renforcera la qualité des interventions et leur efficacité.

15633 Le projet Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) sont caractérisées par une inflammation chronique de la paroi du tube digestif, un déséquilibre de la flore intestinale (ou microbiote) et un défaut de la fonction de barrière intestinale. Nous nous sommes intéressés à des molécules impliquées dans la communication entre les bactéries. Ces molécules sont synthétisées par les bactéries et leur permettent d'adopter un comportement de groupe, en fonction de la densité de population. Notre équipe a récemment mis en évidence plusieurs molécules de ce type dans le microbiote intestinal humain, dont l'une voit sa présence diminuer chez les patients atteints de MICI en période de poussée inflammatoire. De façon intéressante, la présence de cette molécule est associée à un microbiote normal et son absence à un déséquilibre, suggérant des effets protecteurs sur le microbiote intestinal. Grâce à la collaboration avec une équipe de chimistes, des analogues des AHLs ont été synthétisés chimiquement, afin d'obtenir des molécules ayant des effets optimisés par rapport aux molécules naturelles. Notre objectif est de caractériser ces molécules, qui pourraient être de potentielles nouvelles voies thérapeutiques pour les patients atteints de MICI. Nous proposons d'étudier l'impact de ces molécules naturelles et synthétiques sur l'inflammation et l'écosystème intestinal. Dans une première étape, nous avons utilisé un modèle *in vitro* de cellules épithéliales intestinales et des cellules de l'immunité pour mesurer la réponse inflammatoire aux AHLs. Nous avons montré que nos nouvelles molécules possèdent des propriétés anti-inflammatoires. Toutefois, les modèles cellulaires ne permettent pas de prendre en compte la complexité des interactions entre les différents compartiments de l'hôte comme le système immunitaire et le microbiote contenu dans la lumière du tube digestif.

Notre projet a donc maintenant pour objectif d'étudier les effets de ces molécules bactériennes sur l'inflammation et l'écosystème intestinal *in vivo* chez la souris en conditions inflammatoires, au cours d'une colite. Des résultats préliminaires ont montré des effets bénéfiques des AHLs naturelles sur la composition du microbiote intestinal à l'état basal, justifiant de poursuivre l'exploration des effets chez des souris en état inflammatoire. La confirmation *in vivo* que les molécules que nous avons synthétisées et étudiées sont bénéfiques lorsque l'intestin subit une inflammation lors d'une colite apportera de nouvelles connaissances sur les effets protecteurs des interactions hôte/bactéries. C'est une étape indispensable qui permettra d'envisager une piste de traitement innovant pour réduire l'inflammation et restaurer un microbiote normal dans les MICI. Les souris recevront les molécules étudiées par voie orale ou par injection intra-péritonéale pendant 15 jours consécutifs, associées pendant les 5 premiers jours à du Dextran-Sulfate-Sodium (DSS) qui induira une colite inflammatoire. Des selles seront prélevées à plusieurs temps afin d'étudier la composition du microbiote et la santé des souris sera contrôlée quotidiennement. Les souris seront ensuite euthanasiées, afin de prélever leur intestin et de mesurer différents paramètres inflammatoires.

Les animaux

* Type Souris C57BL/6J commerciales (*Mus musculus*)

* Nombre : Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 612 souris expérimentales pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

La conformité au principe des 3R

* Remplacement Une première partie du projet a impliqué une étude *in vitro*, réduisant drastiquement le nombre d'animaux utilisés au cours du projet. Toutefois, les modèles cellulaires ne permettent pas de prendre en compte la complexité des interactions de l'épithélium intestinal avec l'environnement de la lumière du tube digestif et avec les compartiments du milieu intérieur comme le système immunitaire. Un système vivant est donc nécessaire pour étudier les acteurs mis en jeu dans le cadre de ce projet.

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

données de la littérature (variabilité attendue) et des effets espérés, un test de puissance statistique a été utilisé pour déterminer le nombre minimum d'animaux nécessaire pour cette étude.

*Raffinement Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures ont été mises au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal, en limitant la douleur et le stress (anesthésie, analgésie, etc.). Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation, les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum. Le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification ou de maison de type igloo. Nous nous efforçons à chaque instant de raffiner nos procédures afin de garantir le bien-être des animaux en cours de procédure grâce à une surveillance attentive (point limite) et des soins adaptés (anesthésie).

15634 Les sons auxquels nous sommes soumis tous les jours sont dits complexes car composés de multiples fréquences élémentaires. L'identification du cri d'un prédateur, la compréhension de la parole ou la sensibilité à la musique dépendent de la discrimination fine des fréquences sonores contenues dans le son. La dégradation de la discrimination fréquentielle, qu'elle soit d'origine centrale ou périphérique, engendre des déficits dans l'acquisition du langage et la compréhension de la parole. Il est donc fondamental de comprendre comment l'oreille et le cerveau analysent les sons et de déterminer quel est le rôle des systèmes nerveux périphériques et centraux afin d'améliorer les diagnostics de déficits auditifs et proposer de nouvelles solutions de traitement.

Lors de surdité profonde périphérique, on peut rétablir une perception sonore chez le patient grâce à la stimulation du nerf auditif par de petites électrodes insérées le long de la cochlée. Ce dispositif artificiel permet aux patients implantés de comprendre la parole. Cependant, il ne permet pas d'apprécier les sonorités plus complexes comme la musique. En effet, le nombre d'électrode que l'on peut insérer le long de la cochlée est limité à une dizaine car le courant induit par une électrode ne peut pas être focalisé précisément. L'ajout d'électrodes supplémentaire, même s'il est possible, est alors superflu. La qualité du son est donc différente de celle obtenue par l'audition naturelle, car moins d'informations sonores sont transmises au cerveau. Il en résulte que les sons complexes sont difficilement appréciables par les patients implantés et que l'écoute dans le bruit est très délicate.

Dans ce projet, nous visons à développer un nouveau type d'implant cochléaire basé non pas sur la stimulation électrique des terminaisons nerveuses mais sur la stimulation lumineuse des cellules sensorielles. De nouveaux outils génétiques nous permettent de rendre sensible les cellules neuronales à la lumière. Alors qu'il n'est pas physiquement possible de focaliser un courant électrique, on peut facilement focaliser un rayon lumineux. Ce type de stimulation permettrait donc d'améliorer la précision spatiale de la stimulation cochléaire et de pouvoir activer la cochlée avec un plus grand nombre de canaux. Dans une première partie, nous étudierons la faisabilité d'une stimulation optique de la cochlée. Cette nouvelle technique permettra également d'avoir un contrôle fin sur les signaux que la cochlée envoie au cerveau. En contrôlant de façon systématique les signaux cochléaires, nous serons dans une situation idéale pour comprendre comment la perception auditive émerge au niveau cérébral. Ensuite, nous développerons l'implant cochléaire à proprement parler et nous le testerons sur les souris. En étudiant leur capacité à discriminer différents stimuli lumineux, nous serons en mesure d'évaluer quelle information est nécessaire pour identifier des sons complexes. Les résultats permettront de répondre à des questions cruciales à propos de la nature du code neural dans le système auditif et permettront de construire des modèles précis afin d'ouvrir une nouvelle ligne de recherche dans le champ des neurosciences sensorielles. Ils permettront également de développer un nouveau type d'implants cochléaire basé sur la stimulation lumineuse de l'organe auditif. Nous réaliserons dans ce projet nos expériences sur la souris mais transféré à l'humain, un tel dispositif serait potentiellement largement bénéfique pour traiter les surdités profondes.

Le projet impliquera une équipe composée de 5 chercheurs et comporte 9 procédures qui ont été conçues en respectant la règle des 3R. Aujourd'hui, il n'existe aucune alternative pour Remplacer l'expérimentation animale par des expériences *in vitro* car nous avons besoin d'étudier le système auditif dans son ensemble (de l'oreille interne au cortex auditif). Cependant, nous nous attacherons à Réduire le nombre d'animaux utilisés. Ce projet impliquera un total de 1380 souris de laboratoire

sur une durée de 5 ans. Parmi celles-ci, 750 souris entreront dans des procédures modérées (5 procédures) et 630 dans des procédures sans réveil (4 procédures). Des méthodes d'analyse statistique ont été utilisées afin de déterminer la taille optimale des groupes expérimentaux pour répondre aux questions scientifiques posées. Ce chiffre a été estimé avec l'aide d'une équipe de biostatisticiens afin de calculer au mieux le nombre d'animaux nécessaires. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, les animaux seront systématiquement génotypés, les mâles et les femelles seront utilisés sans distinction. Afin de Raffiner l'expérimentation, les souris seront élevées et hébergées dans les conditions optimales. Tous les efforts seront déployés pour s'assurer que l'inconfort, la détresse et la douleur soient réduits au minimum. Les animaux impliqués dans le projet seront suivis régulièrement et seront anesthésiés, lorsque c'est nécessaire, pour éviter toute forme de souffrance. Des traitements analgésiques et antalgiques seront mis en œuvre et adaptés à l'âge des animaux en pré- et post-opératoire pour obtenir une analgésie idéale pour chaque procédure. En fin de procédure ou si nous observons un comportement anormal l'animal serait mis à mort. L'état de santé sera caractérisé par un score d'état corporel qui prend en compte différents facteurs (perte de poids, changement de posture, yeux plissés, manque de toilettage etc.) et qui nous permettra d'évaluer l'état de l'animal tout au long de la procédure et d'intervenir au plus tôt si nécessaire.

15635 L'hépatite E est une infection virale d'origine alimentaire (viande de porc, gibier...) dont l'importance a été longtemps sous-estimée. La principale problématique de cette infection est son évolution vers une forme chronique chez les personnes immunodéprimées, notamment après une greffe d'organe. Notre objectif est de développer des approches expérimentales originales permettant de cultiver le virus en laboratoire et de mettre au point et valider un modèle de porcs immunodéprimés pour étudier l'infection chronique par le virus de l'hépatite E.

La finalité de ce projet est de mieux comprendre les mécanismes aboutissant à l'établissement d'infections chroniques par le virus de l'hépatite E.

Le nombre total d'animaux est de 26 répartis en 2 expérimentations. La première expérimentation, préliminaire, porte sur 6 porcs et a pour objectif de vérifier l'infectiosité de l'inoculum et l'efficacité du traitement immunosuppresseur. La seconde expérimentation porte sur 20 porcs et a pour objectif la mise en place du modèle d'infection chronique.

Ce projet s'inscrit dans la dynamique de respect de la règle des 3 R en expérimentation animale. Aucun modèle *in vitro* ou *ex vivo* ne peut se substituer totalement à ce type d'expérimentation.

Remplacer nous ne pouvons pas remplacer le modèle *in vivo* étant donné l'objectif du projet, qui est de mettre au point un modèle d'étude de l'infection chronique par le virus de l'hépatite E chez l'homme.

Réduire Le nombre d'animaux a été réduit au maximum tout en permettant une étude de faisabilité pour la mise au point du modèle porcin.

Raffiner Les animaux sont hébergés en groupe dans des cases avec enrichissement du milieu de vie. Une surveillance quotidienne des animaux est mise en œuvre afin de veiller à leur bien-être. Certaines procédures sont réalisées avec une récompense alimentaire ou une anesthésie appropriée.

Suite à la crise du COVID19, les 6 animaux de la première expérimentation ont du être euthanasiés 4 jours après leur arrivée. Ils n'ont subi aucune procédure. Le nombre total d'animaux sera de 32 animaux au lieu de 26 prévus initialement.

15636 Ces dernières années, au sein de notre équipe, un vaccin administré par voie nasale a été mis au point et a montré son efficacité contre la toxoplasmose. Ce vaccin induit notamment une réponse immunitaire systémique et locale -cellulaire et humorale- permettant une forte protection contre les phases aiguës et chroniques de la maladie. Cette réponse immunitaire protectrice est celle actuellement recherchée dans la lutte contre le SARS-CoV-2. Fort des résultats obtenus, nous voulons aujourd'hui étudier le potentiel vaccinal de cette stratégie appliquée au SARS-CoV-2. Cette

première étude de faisabilité nécessitera l'utilisation de 144 souris dans le respect de la règle des 3R.

- Remplacement Pour ce projet, il n'existe pas de méthode de substitution qui pourrait restituer fidèlement un modèle de régulation complexe permettant la validation de notre stratégie.

- Réduction Le nombre d'animaux est calculé au plus juste à l'aide d'outils statistiques garantissant une puissance de test de 80% minimum en s'appuyant sur les données de la littérature et l'expérience des différents partenaires de ce projet.

- Raffinement Les souris sont hébergées en accord avec les directives européennes et bénéficient d'un enrichissement social et physique (objets en cellulose pour faire un nid ou à ronger) dans la zone d'hébergement défini par la structure chargée du bien-être animal de l'établissement. Un suivi quotidien de l'état de santé des animaux sera réalisé avec une surveillance systématique de points limites. Tout type de médication pouvant interférer avec la réponse immunitaire est proscrit. Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus.

15637 Ces dernières années, l'immunothérapie, c'est-à-dire la manipulation du système immunitaire du patient pour combattre une tumeur, a ouvert de nouvelles perspectives thérapeutiques en oncologie. Le microbiote intestinal (ensemble des micro-organismes du système digestif) a un impact majeur sur les réponses immunitaires anti-tumorales et l'efficacité des traitements anti-cancer. Plus précisément, certaines molécules issues du microbiote, de l'aliment ou de l'action du microbiote sur l'aliment stimulent le système immunitaire anti-tumoral en agissant sur un récepteur intracellulaire appelé AhR (Aryl hydrocarbon Receptor). Néanmoins, la nature exacte des molécules se fixant sur les récepteurs AhR présents dans les cellules tumorales n'est pas encore connue et leurs mécanismes d'action ne sont pas encore complètement élucidés.

Le but de ce projet est d'étudier le rôle de ces molécules dans la modulation de la réponse immunitaire anti-tumorale au cours d'une immunothérapie.

La souris C57BL/6J est un modèle classique et largement accepté par la communauté scientifique internationale pour étudier l'immunité anti-tumorale. La souris C57BL/6J axénique (dépourvue de micro-organismes vivants détectables) hébergée dans des isolateurs (enceintes confinées stériles) va permettre de répondre au but du projet.

Au cours d'une première étude, les souris axéniques recevront ou non une alimentation spécifique riche en indole (métabolite pouvant se fixer sur le récepteur AhR), puis des cellules tumorales seront injectées sous leur peau afin de créer une tumeur. Certaines souris recevront également une immunothérapie avec un traitement que nous avons préalablement sélectionné grâce à des tests *in vitro*. La croissance tumorale et la réponse immunitaire anti-tumorale seront analysées.

Au cours de la seconde étude, le tube digestif de souris initialement axéniques sera colonisé avec une souche bactérienne non pathogène d'*Escherichia coli*, connue pour produire de l'indole, ou avec la même souche mais mutée pour ne pas produire d'indole. La même procédure expérimentale (injection sous-cutanée de cellules tumorales chez toutes les souris, immunothérapie chez certaines souris) que dans la première étude sera appliquée.

Ces études ont été conçues afin de respecter au mieux la règle des 3R remplacer, réduire et raffiner.

Remplacer le recours aux animaux est indispensable pour ce projet ils ne peuvent être remplacés par des modèles *in vitro* car le processus étudié fait intervenir de nombreuses interactions au sein de l'hôte (relations complexes entre système immunitaire, tumeur, microbiote et alimentation).

Réduire l'effectif de souris a été calculé pour utiliser un nombre minimum mais suffisant d'animaux afin d'obtenir des résultats statistiquement valides. Chaque étude comportera 4 groupes de 8 souris (32 souris) et sera répétée 3 fois (96 souris) afin de s'assurer de la reproductibilité des résultats. De plus, un lot de 32 souris supplémentaires est prévu pour prendre en compte le risque de contamination accidentelle d'un isolateur, risque inhérent à ce type d'expérience. Le nombre maximum de souris utilisées pour ce projet s'élève donc à 224 (2 études impliquant chacune 96 souris et 32 souris supplémentaires).

Raffiner les souris seront hébergées par 4 dans des cages collectives en isolateurs. L'eau et la nourriture seront disponibles à volonté et les paramètres ambiants seront contrôlés (température, humidité, lumière...). Un enrichissement de leur milieu sera mis en place afin de favoriser le bien-être des animaux et se matérialisera par du papier absorbant à déchiqueter, des buchettes de bois à grignoter, des tunnels pour se cacher et des tiges métalliques pour grimper.

En accord avec les recommandations internationales dans le domaine de la cancérologie, les animaux seront suivis quotidiennement et les expériences seront arrêtées avant que le développement tumoral n'entraîne une souffrance des animaux.

15638 Contexte et objectifs :

Le muscle du squelette est capable de se régénérer en cas de lésion. Cette capacité est due à la présence de cellules souches (Pax7+), appelées cellules satellites, situées à proximité des fibres musculaires. Suite à une lésion, les cellules inflammatoires ayant infiltré le tissu envoient des signaux aux cellules satellites activant ainsi successivement leur prolifération, leur différenciation puis leur fusion, ce qui permet le renouvellement des fibres musculaires endommagées. L'utilisation des cellules satellites dans le développement de nouvelles stratégies de thérapie cellulaire pour améliorer la fonction musculaire dans le cadre de myopathies mais également au cours du vieillissement ou lors de traumatismes musculaires est envisagée. Les récepteurs nucléaires Rev-erbA et Rev-erbB contrôlent l'horloge biologique et ont de nombreux rôles dans la régulation du métabolisme énergétique. Des résultats indiquent que chez les souris déficientes pour Rev-erbA, la régénération musculaire est affectée. D'autre part, Rev-erbA et Rev-erbB sont fortement exprimés dans les cellules satellites quiescentes alors que leur expression diminue brutalement dès lors qu'elles sont activées.

L'objectif de ce projet est de démontrer, grâce à des modèles murins d'invalidation ou de sur-expression de Rev-erbA et Rev-erbB ou d'altération environnementale de l'horloge par décalage de phase, le rôle de l'horloge biologique dans la régulation de la régénération musculaire en évaluant spécifiquement leur rôle dans la cellule satellite et dans les cellules inflammatoires. Ce projet fera donc avancer les connaissances sur les fonctions physiologiques de l'horloge en général et des Rev-erbs en particulier.

Pour la réalisation de ce projet, des injections intramusculaires de mytoxines ou de solutions chimiques (BaCl₂) seront réalisées dans le Tibialis Antérieur des différents modèles de souris perte et gain de fonction pour les Rev-erbs ou d'altération environnementale de l'horloge, sous anesthésie générale, afin d'induire la régénération musculaire. Les muscles seront ensuite prélevés à différents moments après la blessure pour diverses analyses.

Justification de l'expérimentation décrite et méthodes mises en oeuvre pour réduire le nombre d'animaux

La régénération musculaire est un processus mis en oeuvre de manière spontanée et chronique chez des patients atteints de myopathies. Afin d'induire le processus de régénération chez la souris, différents modèles ont été développés. Ils sont basés soit sur l'utilisation de mytoxines de venin de serpent (la notexine et la cardiotoxine), soit sur l'utilisation du Chlorure de baryum (BaCl₂) pour induire une blessure chimique. Ces modèles de régénération musculaire présentent des différences en terme de réponse inflammatoire par exemple. Afin d'étudier le rôle des Reverbs dans la régénération musculaire, il est donc primordial d'avoir recours à au moins deux modèles de régénération aigue, comme cela est de plus en plus demandé. Les blessures serviront à étudier le résultat de la communication entre les cellules satellites et les cellules immunitaires dans un contexte patho-physiologique. Cependant, puisqu'il est possible d'isoler ces cellules et de les étudier *in vitro*, de nombreux paramètres seront analysés dans ce sens afin de réduire le nombre d'animaux utilisés. En effet, les cellules satellites s'activent de manière spontanée lorsqu'elles sont sorties de leur niche et mises en culture. D'autre part, nous sommes en train de développer des systèmes de co-cultures qui nous permettront d'étudier la communication entre cellules satellites et cellules immunitaires *in vitro*. Ainsi, les études de régénération *in vivo* ne seront utilisées que pour répondre aux questions qui ne peuvent l'être dans ces expériences *in vitro*. De plus, des procédures

standardisées nous permettront non seulement de diminuer la variabilité mais aussi de comparer les résultats des expériences menées, diminuant ainsi le nombre d'animaux étudiés. Le nombre total d'animaux sera de 3348 souris.

Méthodes mises en oeuvre pour atténuer la souffrance ou le stress induit par les manipulations, et améliorer le bien-être des animaux :

Afin d'atteindre l'objectif, nous évaluerons la conséquence d'une invalidation ou d'une sur-expression de Rev-erb introduite au niveau du corps entier ou dans des cellules ou organes spécifiques (souris génétiquement modifiées). Ces manipulations n'engendrent, par elles-mêmes, aucune souffrance. L'altération environnementale de l'horloge sera réalisée par des avances ou retards de phase dans l'éclairage de la pièce d'hébergement pour mimer un décalage horaire, ce qui n'engendre pas non plus de souffrance. Il est important, notamment puisque la part inflammatoire est importante dans nos modèles, que les animaux soient maintenus dans des conditions d'hébergement dépourvus de stress, et que nos animaux soient maintenus dans un statut sanitaire excellent. Ainsi, la souffrance potentielle engendrée par les procédures mises en oeuvre sera prise en charge grâce à l'utilisation d'analgésiques et d'anesthésiques dès que nécessaire. La procédure d'euthanasie sera mise en oeuvre sous anesthésie (animal inconscient). Enfin, le bien-être de l'animal depuis sa naissance jusqu'à sa mort sera pris en compte grâce à un environnement contrôlé dépourvu de germes pathogènes, la présence d'abris et de jeux dans les cages, une surveillance quotidienne de l'état de santé des animaux, et la prise en compte de tout signe physique de stress ainsi que de la hiérarchie sociale. Les procédures décrites (blessures par injection de venin et par le Chlorure de barium (BaCl₂) sont des procédures utilisées par la communauté travaillant sur la régénération musculaire.

15639 La mise en œuvre des réglementations portant sur l'expérimentation animale inscrite dans le droit français depuis février 2013 précise les obligations réglementaires de formations pour les chercheurs qui souhaitent utiliser des approches chirurgicales sur des rongeurs.

Dans ce contexte, une formation niveau à la chirurgie des rongeurs (rats, souris) a été mise en place, l'approche pédagogique choisie privilégie la pratique sur l'animal ce qui implique un dépôt du projet décrit ci-après.

Cette formation est réservée aux étudiants doctorants ou chercheurs qui ont déjà validé une formation de niveau « Conception », ou qui ont eu un équivalent européen, validé en France. Cette formation agréée existe depuis plus de 15 ans, elle a su s'adapter aux nouvelles approches et aux nouvelles réglementations.

Cette formation en chirurgie sur rongeurs a pour objectif de permettre aux participants d'acquérir les gestes de base nécessaires à la réalisation d'actes chirurgicaux dans les conditions optimales, en veillant que le bien-être de l'animal soit respecté. L'approche pédagogique combine des approches théoriques (films, images, modèles plastiques etc.) et l'approche pratique sur animaux dans un contexte d'encadrement soigné et vigilant, en particulier sur le traitement de la douleur pendant l'intervention ou en post-opératoire.

Cette formation ouverte de deux à six sessions par an et accueille au maximum 12 participants par session. Elle sera principalement proposée aux étudiants de l'école doctorale de notre université, mais pourra aussi être ponctuellement proposée à des chercheurs des organismes de recherche, ou des chercheurs post-doctorants, afin qu'ils puissent satisfaire aux obligations légales dans le cadre de projet de recherche.

Conformément à la règle et à l'esprit des 3R, une attention particulière a été portée afin d'optimiser au mieux les protocoles, de réduire le nombre d'animaux utilisés et d'améliorer et raffiner leurs conditions de vie.

Remplacement La partie théorique qui précède la partie pratique utilise différents supports et méthodes alternatives (vidéos, modèles plastiques, sutures sur pieds de porc) afin que les stagiaires appréhendent et visualisent au mieux les manipulations et étapes d'une opération avant de débiter la pratique sur l'animal. La mise en œuvre de ces manipulations en situation réelle est nécessaire à la formation et les méthodes alternatives ne peuvent en aucun cas remplacer

totallement la mise en œuvre pratique. En effet, ces méthodes ne permettent pas de combiner et améliorer les apprentissages inhérents à l'intervention; de mettre l'expérimentateur en condition réelle pour faire face à la pression implicite de réussir à effectuer l'opération sur un animal vivant sans lui occasionner une quelconque souffrance, et de retranscrire toute la finesse des signes physiologiques et comportementaux à repérer par la vision et le toucher pour identifier les signes de confort opératoire satisfaisant ou les prémisses d'éveil, voire de mal être, chez l'animal.

Raffinement Les animaux auront accès ad libitum à l'eau et à la nourriture, bénéficieront de conditions de température et d'hygrométrie régulées et conformes à la réglementation en vigueur. L'enrichissement de l'environnement des animaux (bâtonnets à ronger, matériel de nidification), le maintien des interactions sociales (hébergements de plusieurs individus dans une même cage) et la surveillance quotidienne des animaux permettront de s'assurer de leurs bien-être et de détecter rapidement tout changement de comportement associé ou non à la pathologie étudiée afin qu'il puisse être pris en charge. Des points-limites permettant de soustraire l'animal à la souffrance ont été établis. De plus nous appliquerons systématiquement le principe de raffinement au niveau des méthodes de pré-anesthésie, d'anesthésie et de prise en charge analgésique de nos animaux.

Réduction Le nombre d'animaux est réduit au maximum grâce à la partie théorique de la formation qui précède la partie pratique utilise différents supports et méthodes alternatives pour permettre aux stagiaires d'appréhender au mieux les manipulations avant de débiter la partie pratique et ce afin de limiter au maximum le nombre d'animaux nécessaires à la formation. Lors de cette formation, le nombre d'animaux (rat/souris) sera réduit au maximum (un animal par atelier et par participant ou par binôme). L'objectif tout en permettant aux participants d'acquérir les compétences escomptées afin de leur permettre de réaliser ensuite leur travail de recherche selon les bonnes pratiques en expérimentation animale et en accord avec la réglementation européenne.

De plus, il est important de préciser que la totalité des animaux utilisés lors de ces formations sont des animaux de réforme destinés à être mis à mort.

Sur 5 ans cette formation nécessitera au maximum 840 rats et 1500 souris.

15640 Certains des canaux présents dans la membrane des cellules neuronales jouent un rôle majeur dans leur excitabilité. Les mutations qui affectent ces canaux d'intérêt sont à l'origine de troubles du spectre autistique ou schizophrénique et/ou d'épilepsie pouvant, pour les formes les plus sévères, être associées à un déficit intellectuel. Nous disposons d'un modèle de souris déficientes pour ces canaux d'intérêt qui reproduit un type de mutations identifié chez l'homme et dont nous avons tout récemment caractérisé le phénotype comportemental. Nous avons montré que ces souris présentaient, au cours de leur développement, un phénotype de type autistique qui s'atténuait considérablement à l'âge adulte. Une autre équipe a montré parallèlement que ces souris présentaient également à l'âge adulte des crises de type absence (indétectables en l'absence d'un enregistrement de l'activité cérébrale) qui sont considérées comme une forme bénigne d'épilepsie chez l'homme. Les différents indicateurs permettant d'évaluer si un phénotype est dommageable tels que la taille des portées, la courbe de poids ou encore l'aspect du pelage sont similaires entre les souris sauvages et les souris déficientes pour les canaux d'intérêt.

Notre projet de recherche vise à approfondir la caractérisation du phénotype et à identifier les mécanismes et circuits neuronaux impliqués dans l'apparition des troubles autistiques et épileptiques de ces souris. Pour ce faire, nous administrerons différents composés pharmacologiques soit par voie périphérique soit localement dans différentes régions cérébrales susceptibles d'atténuer, de maintenir ou d'amplifier ces différents troubles et ce, chez les souris jeunes (entre 3 et 6 semaines) et les souris adultes (>P65-P70). Les troubles autistiques seront évalués à l'aide de tests comportementaux spécifiques et l'activité cérébrale à l'aide d'électrodes corticales ou sous-corticales.

Nous avons établi notre projet de recherche en tenant compte de la règle des 3R. Ainsi, afin de répondre au principe de remplacement, nous réaliserons, parallèlement aux expérimentations *in vivo*, quand cela sera possible, des études sur culture de neurones ou tranches de cerveau. Nous avons réduit au maximum le nombre d'animaux nécessaires dans chacune des procédures tout en

s'assurant d'avoir le nombre suffisant pour interpréter nos expériences sur le plan statistique (par exemple, utilisation des mêmes animaux pour différents traitements pharmacologiques dans les procédures 2, 3 et 5). Enfin, toutes les mesures de raffinement appropriées seront prises pour éviter toute souffrance ou inconfort à l'animal en particulier pour les procédures chirurgicales. Ainsi, toutes les souris seront élevées dans un environnement enrichi (social et physique) et une manipulation régulière des animaux sera réalisée afin de réduire leur stress. Un autre exemple de mesure de raffinement sera l'administration d'un anti-inflammatoire dans l'eau de boisson pendant la période post-opératoire. Un suivi journalier permettra d'évaluer leur état de santé et ainsi d'intervenir rapidement par rapport aux points limites définis. Le nombre maximal de souris estimé pour ce projet d'une durée de 5 ans est de 2238.

15641 Dans la situation sanitaire actuelle, un certain nombre de données scientifiques doivent être produites dans l'urgence face à une pandémie provoquée par un coronavirus à la fois très transmissible et pathogène pour l'Homme. La maladie provoquée chez l'Homme est majoritairement à expression pulmonaire et hématologique mais un certain nombre de questions demeurent. Chez les animaux le virus a pu être inoculé chez les chats et les furets qui ont présenté une excrétion virale par voie respiratoire et fécale. Toutefois avant de se servir de modèles animaux carnivores, il nous semble raisonnable d'effectuer un certain nombre d'essais sur rongeurs pour des raisons de faisabilité, notamment de capacité à maintenir un confinement microbiologique satisfaisant pour les personnels intervenant sur les animaux en raison de leur taille. Mais aussi, accessoirement, nous préférons utiliser des rongeurs que des espèces d'animaux de compagnie.

Les études visées dans ce projet concernent les rongeurs, espèces modèles de l'infection par le coronavirus et principalement une lignée de souris transgéniques pour l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 humaine mais aussi le hamster doré (*Mesocricetus aureus*) qui est permissif pour ce virus sans modification génétique. Les objectifs sont de trois ordres, si nous simplifions à l'extrême, le premier objectif est de décrire la maladie dans ce modèle (populations cellulaires et tissus cibles, types de signes cliniques, histologiques, biochimiques, etc), de tester des préparations vaccinales et enfin de tester des thérapies. Dans les trois cas, ces animaux seraient inoculés avec le virus responsable de l'actuelle pandémie. Des différences assez triviales entre les trois procédures existent également (inoculation simple, vaccination puis épreuve virale, inoculation puis tentative thérapeutique - dans ce dernier cas, la faisabilité est inconnue à ce stade et dépend de la fenêtre temporelle après inoculation).

Pour l'instant le nombre total d'animaux est inconnu car il dépendra du nombre d'essais que nous serons amenés à mener en raison du développement de prophylaxies ou de traitements mais aussi de la disponibilité des animaux. Nous estimons qu'un nombre maximum de 250 animaux pour la durée du projet est suffisant.

Pour la procédure concernant la description de l'évolution de la clinique post infection, et dans un objectif de réduction aussi grand que possible du nombre d'animaux, nous estimons le nombre de souris nécessaire à 5. Il est possible que cette procédure doive être répétée en fonction de nos capacités à produire une maladie infectieuse stable avec les souches virales mises à disposition. Nous estimons que pour chaque procédure impliquant un traitement le nombre d'animaux sera de 8 (3 contrôles et 5 animaux traités, le nombre d'animaux traités est plus important afin d'évaluer la variance d'efficacité des traitements). Dans toute la mesure du possible, nous réduirons le nombre d'animaux contrôles. Si nous estimons le nombre d'essais par an à 5 en sus de la première étape, le nombre total serait de 50 animaux par an.

Comme nous ne connaissons pas l'évolution d'une infection par ce coronavirus et la souche du virus en particulier dans les espèces de rongeurs en question, il est possible que nous observions quelques morts trop rapides pour pouvoir mettre en place un suivi clinique suffisamment efficace pour éviter que les animaux entrent en phase clinique (points limites). En tout état de cause les animaux seront hébergés en groupes sociaux avec un équipement d'enrichissement de leur habitat associant une cabane et des éléments cartonnés ou en bois destinés à être grignotés.

15642 Au cours des dernières années, le pronostic de nombreux cancers s'est nettement amélioré. L'une des raisons de ce succès est la survenue possible chez les survivants d'une toxicité cardiaque induite par la chimiothérapie et appelée cardiomyopathie dilatée. Ainsi une étude rétrospective sur les survivants à 30 ans d'un cancer dans l'enfance a-t-elle montré que ces patients avaient un risque de développer une insuffisance cardiaque quinze fois supérieure à celle d'une population témoin. La reconnaissance de ce risque a conduit à des mesures préventives (strict contrôle des facteurs de risque cardio-vasculaire, réduction des doses) dont aucune n'est totalement efficace pour prévenir la survenue de cette complication.

Les résultats inconstants des médicaments classiques justifient d'explorer de nouvelles approches thérapeutiques parmi lesquelles la thérapie cellulaire et trois essais cliniques testant l'administration de cellules souches dans des cardiopathies induites par les chimiothérapies sont actuellement en cours ou imminents.

Les cellules produisent des vésicules extracellulaires. Agissant en véritables navettes, ces vésicules extracellulaires jouent un rôle clé dans la communication intercellulaire et peuvent agir sur diverses voies de signalisation cellulaire. Ces « jus » de cellules pourraient avoir des capacités régénératrices. Aussi l'objectif de ce projet est-il de tester l'effet d'une administration intraveineuse de vésicules extracellulaires sécrétées par des cellules progénitrices cardio-vasculaires, par comparaison avec un traitement médicamenteux classique, dans un modèle murin de cardiopathie dilatée induite par la chimiothérapie.

15 jours après l'administration de la chimiothérapie les animaux seront classés en trois groupes recevant soit une administration intraveineuse d'une solution placebo (contrôle), soit des vésicules extracellulaires soit du traitement de référence pendant deux semaines. Les résultats seront évalués 8 semaines après le début de la chimiothérapie sur des critères fonctionnels (échocardiographie ou imagerie à résonance magnétique reflétant la contractilité cardiaque). Les animaux seront ensuite mis à mort afin d'évaluer les résultats sur d'autres critères histologiques (étude des tissus à l'échelle microscopique) et transcriptomiques (identification des gènes exprimés).

Amendement du projet :

Afin de prendre en compte les difficultés de mise en place du modèle dans le projet précédent, certaines modifications ont été décidées afin d'optimiser l'étude choisir une autre lignée murine plus sensible à la chimiothérapie, diminution de la dose servant à créer la cardiopathie, diminution de la durée de suivi des animaux, méthodes d'injection améliorées (choix de la voie intraveineuse via le sinus rétro-orbital), évaluation par imagerie à résonance magnétique en plus de l'échographie. Les lots sont plus importants en raison d'une très grande hétérogénéité de réponse en fonction des individus ce que confirment plusieurs études qui ont été publiées depuis. Ceci explique le nombre plus important de souris.

Ce projet nécessitera l'utilisation de 264 souris, qui, suite à une administration de chimiothérapie développeront une cardiomyopathie dilatée.

Conformément aux exigences de remplacement, de réduction et de raffinement : nous avons déjà effectué plusieurs études *in vitro*, pour présélectionner le type cellulaire le plus prometteur pour cette expérience chez l'animal. Nous avons trouvé que les vésicules extracellulaires sécrétées par les progéniteurs cardiaques humains ont des effets positifs sur les cardiomyocytes en culture, ce qui satisfait à la règle de remplacement.

Il n'est pas possible d'évaluer le potentiel thérapeutique de cellules et de vésicules extra cellulaires sur la fonction cardiaque sans recours à un modèle animal. Les rongeurs sont des mammifères ayant un système cardiovasculaire proche de l'humain. Les tests chez le rongeur font partie des tests précliniques classiques pour évaluer l'effet thérapeutique d'un produit.

La réalisation de ce projet constitue une des étapes précliniques indispensables avant l'application chez l'homme de ces approches thérapeutiques.

Une étude statistique a été réalisée afin de minimiser le nombre d'animaux utilisés dans le projet sans compromettre l'analyse statistique des résultats.

Pour ce qui est du raffinement, le nombre d'imageries a été réduit à son minimum et elles seront réalisées, ainsi que les injections des traitements, sous anesthésie générale. Des antalgiques sont prévus en cas de nécessité. De plus, des points limites sont établis et tous les animaux qui ont atteint ces points limites seront euthanasiés précocement.

Si l'administration de vésicules extracellulaires par voie intraveineuse se révélait efficace dans la cardiomyopathie dilatée induite par la chimiothérapie, il s'agirait d'un préalable important pour une utilisation future et sûre chez l'homme.

15643 La schizophrénie est une maladie psychiatrique chronique fortement invalidante qui se déclare généralement entre 15 et 25 ans. Sa fréquence (environ 1% de la population générale) et ses conséquences majeures sur la vie personnelle, sociale, et professionnelle des patients et de leur entourage en font un véritable enjeu médical et socioéconomique. La connaissance des mécanismes physiopathologiques impliqués dans la schizophrénie reste limitée, notamment en raison de la complexité des interactions entre facteurs de risque génétiques et environnementaux sur le développement normal du système nerveux central (SNC) lors de sa formation *in utero* jusqu'à sa maturation à l'adolescence. Mieux appréhender l'impact de ces différents facteurs est un enjeu majeur dans la recherche de nouvelles thérapies et méthodes de prévention.

Nous avons montré l'existence d'une dérégulation de la Neuropiline 1, chez des patients ayant développé une schizophrénie à l'adolescence. Cependant, les fonctions de la neuropiline lors de la maturation du cerveau à l'adolescence et ses interactions avec la prise de cannabis (facteur de risque pouvant précipiter le développement de la schizophrénie) n'ont pas encore été élucidées.

Ce projet propose d'étudier le rôle de la Neuropiline 1 dans des structures cérébrales clés pour la schizophrénie lors du développement du SNC et lors de la prise de cannabis à l'adolescence à l'aide d'un modèle animal afin de tester sa possible implication dans la physiopathologie de la schizophrénie.

Nous prévoyons d'utiliser 1288 rats sur 5 ans.

Notre projet mettra en jeu des procédures chirurgicales, d'administration de substances pharmacologiques avant étude physiologique (imagerie fonctionnelle par ultra-sons, électrophysiologie) ou anatomique et une évaluation des comportements s'apparentant à l'anxiété, la psychose et des fonctions cognitives à l'aide de différents tests comportementaux. Cette étude qui nécessite une approche comportementale n'est possible qu'à l'échelle de l'organisme entier et ne peut être reproduite *in vitro* ni *ex vivo*.

Ce projet s'effectuera dans le respect de la règle des 3R, en veillant au bien-être des animaux et en limitant leur douleur. Pour réduire le nombre d'animaux, nous avons estimé la taille des échantillons permettant une analyse statistique efficace des résultats grâce aux données collectées au cours d'expériences précédentes. Pour éviter toute souffrance les procédures de chirurgie et de prélèvement se feront sous anesthésie générale. Les animaux seront observés quotidiennement et évalués à l'aide de points limites bien définis.

Les résultats attendus permettront d'améliorer l'évaluation des risques de développer une schizophrénie chez les adolescents présentant des difficultés psychiques et d'adapter la prise en charge. Par ailleurs, la meilleure compréhension moléculaire et cellulaire du déclenchement de la schizophrénie permettra d'envisager des soins spécifiquement adaptés à ces sujets et à visée préventive.

15644 Le cancer de la prostate est la seconde cause de décès par cancer chez l'homme. Il s'agit d'un cancer dépendant des hormones sexuelles mâles, appelées androgènes. Quand la tumeur reste localisée dans la prostate, l'ablation chirurgicale de la prostate est la solution idéale. Une fois métastatique, les traitements hormonaux par suppression androgénique s'imposent. Toutefois, des résistances à la privation androgénique apparaissent, favorisant davantage la dissémination des tumeurs aux autres organes. A ce stade, les options thérapeutiques restent limitées et l'évolution de la maladie est souvent létale. L'inefficacité de l'hormonothérapie et de la chimiothérapie pour ces

patients, souligne l'urgence d'identifier des voies biologiques contrôlant la signalisation des androgènes afin de freiner ou éradiquer la progression tumorale.

Dans cette perspective, nous avons récemment identifié un nouveau facteur, capable d'interférer sur la signalisation androgénique, en freinant la prolifération des cellules métastatiques cancéreuses de prostate résistantes aux traitements de privation androgénique. Après avoir analysé son impact sur des cultures cellulaires, nous avons besoin à ce stade, de connaître son rôle dans le contexte d'un organisme vivant. Pour ce faire, nous souhaitons implanter chez des souris immunodéprimées ou immunocompétentes, des cellules cancéreuses humaines ou murines qui seront génétiquement modifiées ou non pour le facteur d'intérêt. Nous procéderons ensuite à une analyse comparative entre les groupes contrôles et ceux altérés pour le facteur d'intérêt, et mesurerons les effets de la modulation des niveaux d'expression du facteur d'intérêt sur la progression du cancer de la prostate. Nous tenterons ainsi de conforter que la déplétion de notre protéine d'intérêt permet de freiner chez la souris, la progression des tumeurs de prostate et leur dissémination aux autres sites de l'organisme.

Au cours de ce projet, nous appliquerons la règle des 3R.

Remplacer : En préambule à nos expérimentations animales, nous avons réalisé des expériences en cellules et réussi à valider l'impact de notre protéine d'intérêt, dans un contexte *in vitro*. En l'état actuel des connaissances, aucune méthode de substitution ne nous permet de récapituler l'impact de la modulation des niveaux d'expression de notre facteur d'intérêt sur la progression tumorale, dans un organisme entier. L'emploi d'un modèle animal comme la souris, récapitulant la physiopathologie des cancers chez les mammifères, est à ce stade, essentielle. L'utilisation d'animaux vivants nous permettra non seulement de conforter nos résultats cellulaires dans un système intégré, mais aussi d'entrevoir la possibilité future de transférer nos résultats en clinique et pouvoir à plus long terme, faire bénéficier les patients atteints du cancer de la prostate, des retombées de nos recherches.

Raffiner : Dans un souci de raffinement, nous mettons en place toutes les dispositions permettant de minimiser les souffrances éventuelles qui pourraient être associées à nos expériences. Un suivi quotidien grâce à l'utilisation de grille d'observations cliniques à partir de critères objectifs incluant des mesures biologiques et des observations normalisées, permettra de détecter précocement toute souffrance potentielle des souris et de décider du devenir de l'animal par la mise en oeuvre de points limites adaptés. De plus, nous aurons recours à l'imagerie *in vivo* pour toutes nos expérimentations, afin de réduire les procédures invasives, limiter les temps de suivi de progression tumorale et éviter la souffrance des souris.

Réduire : Nous limiterons la taille des échantillons à ce qui est strictement nécessaire pour garantir une puissance statistique acceptable. Afin de calculer la taille de l'échantillon nécessaire statistiquement, nous avons réalisé un calcul de puissance, test qui permet de minimiser le nombre d'animaux nécessaires pour valider ou non, notre hypothèse de départ. De plus, certaines procédures ne seront réalisées que dans le cas où les expériences auront des résultats les justifiant. Le nombre total de souris prévues pour l'ensemble des procédures de ce projet, est de : 280. A l'issue de ce projet, toutes les souris utilisées seront euthanasiées.

15645 Un cancer (ou tumeur maligne) est une maladie caractérisée par une prolifération cellulaire anormalement importante au sein d'un tissu normal de l'organisme, qui compromet la survie de ce dernier. Toutes ces cellules dérivent d'une cellule initiatrice du cancer qui a acquis certaines caractéristiques lui permettant de se diviser indéfiniment. Au cours de l'évolution de la maladie, certaines cellules peuvent migrer de leur lieu de production et former des métastases. Chaque année, environ 14 millions de cancers sont diagnostiqués à travers le monde responsable de plus de 8 millions de décès. En France, ce sont 385 000 cancers diagnostiqués chaque année, le cancer représentant la première cause de mortalité chez les hommes et la seconde chez les femmes.

L'approche pour le traitement du cancer a profondément évolué ces dernières années. La chirurgie et la radiothérapie pour des cancers très localisés, la chimiothérapie pour des cancers plus diffus et les thérapies ciblées pour des cancers ayant des mutations génétiques particulières en étaient la

Pierre angulaire. L'immuno-oncologie représente aujourd'hui une nouvelle approche thérapeutique. Sa particularité n'est pas de cibler directement la tumeur comme les autres stratégies thérapeutiques, mais d'aider à restaurer le bon fonctionnement du système immunitaire pour lui permettre de défendre l'organisme en reconnaissant et détruisant les cellules tumorales. L'immuno-oncologie représente une avancée majeure dans le traitement du cancer. Son application concrète remonte au début des années 2010. Les preuves cliniques de son efficacité démontrent son potentiel dans le traitement de certains cancers à un stade avancé. Pour les tumeurs pour lesquelles la prise en charge est complexe et les possibilités thérapeutiques limitées, le besoin médical en traitements innovants et efficaces est considérable. Cette voie de traitement ouvre de nouvelles possibilités thérapeutiques, avec le potentiel d'offrir à certains patients une chance de survie prolongée et une meilleure qualité de vie.

L'immuno-oncologie est aujourd'hui en plein essor. Le blocage des « points de contrôle » immunitaires est la voie plus avancée mais d'autres stratégies sont également à l'étude. En l'occurrence, ce peut être le cas de nouvelles molécules thérapeutiques dont l'objectif est de moduler la réponse immunitaire anti-tumorale en modifiant le recrutement ou l'activation de cellules immunes effectrices au sein du microenvironnement tumoral, affectant ainsi la croissance des lésions. La thérapie cellulaire qui consiste à infuser dans l'organisme du patient des cellules immunes réactives contre les tumeurs est une autre stratégie prometteuse en immunothérapie du cancer. En effet, il serait intéressant d'évaluer l'impact de nouvelles stratégies basées sur l'injection de cellules immunitaires génétiquement modifiées sur la pousse tumorale, afin de déterminer la faisabilité de telles approches novatrices en oncologie.

Le projet présenté ici consiste à établir un protocole qui servira à évaluer l'efficacité de nouvelles stratégies immunothérapeutiques dans le modèle murin, arborant les caractéristiques décrites ci-dessus dans les phases précoces de validations expérimentales de nouveaux candidats thérapeutiques.

Dans ce contexte, le nombre d'animaux utilisé dans le cadre de ce projet est évalué dans le respect de la règle des 3R

- Remplacer et Réduire le nombre nécessaire de souris a été calculé afin de couvrir les différentes études qui permettront d'investiguer l'efficacité des nouvelles molécules et de fournir des résultats statistiquement significatifs. Les données obtenues pour chaque paramètre sur des animaux traités pourront être comparées aux données obtenues sur des animaux ayant reçu un traitement placebo et/ou un traitement de référence et permettre ainsi l'évaluation précise de l'efficacité de nouveaux candidats médicaments.

Le remplacement des animaux est impossible à mettre en place du fait de la nécessité d'étudier l'efficacité dans un modèle *in vivo* complexe, impossible à mimer *in vitro*.

- Raffiner Afin de limiter le stress, les animaux sont hébergés de 2 à 5 par cage avec 2 enrichissements de milieu, au minimum.

De plus, les prélèvements sanguins seront réalisés sous anesthésie générale (gazeuse à l'isoflurane) et les volumes ainsi que les fréquences de prélèvement suivront les recommandations du CEEA.

Les points limites relatifs à la perte de poids, à l'apparence et au comportement des animaux (prostration, poils piqués, isolement, difficultés respiratoires (dyspnée), paralysie, etc.), à l'aspect et aux volumes des tumeurs (nécrose, volume supérieur ou égal à 1500 mm³), sont des critères qui justifieront le sacrifice des animaux.

Le nombre total d'animaux est évalué au maximum à 11200 sur 5 ans.

15646 L'obésité est un problème majeur de santé publique dans le monde. En France, 17% de la population adulte est obèse, et 50% en obésité ou en surpoids. La prise en charge première de l'obésité consiste en une éducation thérapeutique du patient (suivi diététique, activité physique et prise en charge psychologique). Cependant, les taux d'échec élevés ont conduit à une nette augmentation de la chirurgie bariatrique chez les patients présentant un IMC > 40 Kg/m² (ou > 35 Kg/m² avec une comorbidité). Ainsi, le nombre d'interventions de chirurgie bariatrique a triplé en 10

ans en France pour atteindre 60 000 interventions par an en 2016, et concerne majoritairement les femmes (80%) avec un âge moyen à chirurgie de 41.6 ans. En outre, beaucoup de femmes jeunes choisissent ce type de traitement pour restaurer leur fertilité, avec des conséquences à moyen et long terme encore non connues pour leur descendance sur leur prédisposition à développer obésité ou syndrome métabolique. Ces traitements lourds permettent une perte de poids significative et durable, et une amélioration des comorbidités liées à l'obésité (hypertension artérielle, diabète, dyslipidémies, apnée du sommeil, stéatose hépatique), mais de plus en plus d'études montrent l'existence d'un effet délétère non expliqué de la chirurgie bariatrique sur le métabolisme osseux avec une augmentation du risque fracturaire, en particulier après des interventions dites mixtes (restrictives et malabsorptives) comme le by-pass gastrique. Quelques études, chez l'homme comme chez le rat, ont montré qu'il y avait une accélération du remodelage osseux après by-pass gastrique, confirmée par des augmentations des marqueurs sériques de la résorption et de la formation osseuse. Après sleeve gastrectomie, procédure exclusivement restrictive, les marqueurs sériques du remodelage osseux sont également augmentés, de manière similaire ou moindre par rapport au by-pass gastrique. Les mesures ostéodensitométriques montrent une diminution de la densité minérale osseuse après chirurgie bariatrique, mais les données contradictoires ne permettent pas de relier formellement ces mesures densitométriques au risque fracturaire. Il est donc important d'évaluer plus précisément le risque fracturaire après interventions de chirurgie bariatrique : sleeve gastrectomie et by-pass gastrique, d'en comprendre les causes (structure, composition moléculaire) et de faire le lien avec la fiabilité de l'ostéodensitométrie comme moyen de dépistage précoce de ce risque. Il est également important de rechercher si la chirurgie bariatrique maternelle pré-conceptionnelle, de par des mécanismes épigénétiques, carenciels, ou liés au microbiote intestinal, pourrait entraîner un risque de fragilité osseuse également dans la descendance des mères opérées, afin de pouvoir mettre en place des stratégies de prévention précoces pour ces enfants.

Pour cela, nous allons compléter l'étude déjà en cours dans notre laboratoire sur les répercussions de la chirurgie bariatrique maternelle préconceptionnelle dans la descendance (projet MAC DOO, APAFIS#10697-2017091422557044v1) par des analyses de densité osseuse chez les femelles Sprague-Dawley après 8 semaines de régime high fat high sugar, après chirurgie bariatrique, au sevrage et au sacrifice à 6 mois post-chirurgie. Ces mesures ainsi que les marqueurs sanguins de fragilité osseuse seront également testées dans leur descendance à 3, 6, 12 et 18 mois de suivi. En outre, une seconde expérimentation sur des rats mâles et femelles (n=6 par groupe) rendus obèses et opérés d'un by-pass ou d'une sleeve gastrectomie, et traités en parallèle par injections intra-musculaires de vitamine D (cholecalciferol, 500 UI/Kg), d'un analogue stable du GIP (glucose-dependent insulintropic polypeptide), une hormone gastro-intestinale, ou d'un placebo.

Dans le respect de la règle des 3R, l'évaluation de l'effet d'une molécule et les répercussions d'une intervention chirurgicale ne peuvent pas être évaluées sur un modèle *in vitro*, et nécessitent l'utilisation d'animaux. L'utilisation d'un modèle murin permettra l'obtention de résultats rapides impossibles avec le suivi d'une cohorte humaine. Au total, il est prévu d'utiliser 223 animaux pour cette expérimentation. Ce nombre représente le maximum d'animaux utilisés, en sachant que pour chaque groupe opéré (sham obèse ou normo-pondéraux, by-pass gastrique et sleeve gastrectomie), il est prévu un nombre d'animaux prenant en compte les taux de mortalité péri-opératoires, et que le nombre d'interventions sera stoppé dès l'obtention du minimum d'animaux vivants nécessaires à la poursuite du protocole. De plus, pour ce qui concerne l'étude des mères et de leur descendance, nous utiliserons autant que possible les animaux déjà en cours de protocole MAC DOO, et n'ajouterons d'animaux que pour compléter les groupes. Enfin, tous les tests statistiques utilisés seront non paramétriques, pour s'affranchir de la contrainte de nombre inhérente à l'utilisation des tests standards paramétriques. La gestion du bien-être animal sera assurée par un habitat optimisé, en petits groupes de 5 individus avec un enrichissement dans la cage, une surveillance clinique quotidienne, et l'utilisation systématique de molécules antalgiques adaptées à tout geste potentiellement douloureux. Tous ces gestes seront faits sous anesthésie générale (isoflurane 3% v/v O₂, 1.5L O₂/min). L'évaluation de l'évolution de paramètres biologiques ou morphologiques sera faite dans la mesure du possible par des méthodes de diagnostic non invasif

plutôt que de nécessiter des sacrifices itératifs d'animaux. Des points critiques ont été définis quant au seuil de souffrance nécessitant l'euthanasie de l'animal (voir 3.4.13 cidessous).

15647 En France, 385 000 cas de cancer sont diagnostiqués chaque année, le cancer représentant la première cause de mortalité chez les hommes et la seconde chez les femmes. Ces trente dernières années, l'émergence de nouvelles technologies a permis de caractériser en profondeur les tumeurs ainsi que leurs infiltrats de cellules immunitaires. La génération d'un environnement immunosuppresseur au sein des tumeurs est le point de départ de l'échappement des cellules tumorales à l'immunosurveillance. Les immunothérapies ont pour but de restaurer cette surveillance immunitaire en recréant un environnement favorable au recrutement et à l'activation des cellules du système immunitaire infiltrant la tumeur. Le présent projet s'inscrit dans cette dynamique thérapeutique. En effet, CD39 est une molécule exprimée par les cellules endothéliales et par de nombreuses cellules du système immunitaire et des cellules tumorales. CD39, ainsi que CD73 jouent tous deux un rôle dans la métabolisation de l'ATP (Adenosine Tri-Phosphate) en adénosine. Cette dernière est décrite comme ayant un rôle immunosuppresseur en inhibant les fonctions effectrices des lymphocytes. Ces points de contrôle de l'activité des cellules immunes constituent donc des cibles thérapeutiques intéressantes. Les blocages des activités de CD39 et CD73 pourraient ainsi contribuer à la réversion de l'environnement tumoral immunosuppresseur en un environnement immunoactivateur. Notre laboratoire développe avec des partenaires deux anticorps thérapeutiques ciblant CD39 et CD73. Le but du présent projet est de démontrer, dans des modèles murins, que ces anticorps, combinés entre eux ou avec des chimiothérapies ou d'autres anticorps thérapeutiques ont une activité anti-tumorale. Les systèmes immunitaires de l'homme et de la souris présentant de nombreuses analogies fonctionnelles, en particulier en ce qui concerne les voies adénosine, la souris apparaît comme le modèle animal le plus pertinent. Il mime en effet la complexité des interactions des cellules immunes chez l'homme.

Dans ce contexte, afin de respecter la règle des 3 R

-Remplacer et Réduire le nombre nécessaire de souris a été calculé afin de couvrir les différentes études qui permettront d'investiguer les effets anti-tumoraux du blocage des récepteurs CD39 et/ou CD73 et de fournir des résultats statistiquement significatifs. Les données obtenues pour chaque paramètre sur des animaux traités pourront être comparées aux données obtenues sur des animaux ayant reçu un traitement placebo et/ou un traitement de référence et permettre ainsi l'évaluation précise de l'efficacité de nouveaux candidats médicaments. Le remplacement des animaux est impossible à mettre en place du fait de la nécessité d'étudier l'efficacité dans un modèle *in vivo* complexe, impossible à mimer *in vitro*.

-Raffiner pour minimiser la douleur et le stress des animaux, les conditions d'hébergement des animaux sont optimisées, par l'enrichissement dans les cages (copeaux de bois compactés et/ou coton), et par le maintien des animaux en groupes de 5 maximum afin d'éviter le stress de l'isolement. Les prélèvements sanguins seront réalisés sous anesthésie générale (gazeuse) et les volumes ainsi que les fréquences de prélèvement suivront les recommandations du CEPAL.

Pour les protocoles nécessitant de la chirurgie, source de douleur, les animaux seront anesthésiés par voie gazeuse et pré-médiqués avec de la buprénorphine et un anti-inflammatoire non stéroïdien afin de réduire les douleurs liées à l'intervention chirurgicale. En post-opératoire, un antidouleur et un anti-inflammatoire seront administrés pendant les 72 heures qui suivent l'intervention. Des tapis chauffants seront utilisés tout au long des interventions chirurgicales. Dans ce projet, nous planifions l'utilisation de deux lignées de souris génétiquement modifiées l'une modifiée pour exprimer à la place de la molécule CD39 murine, la molécule CD39 humaine (CD39KI), l'autre, pour exprimer à la place de la molécule CD73 murine, la molécule CD73 humaine (CD73KI). Le projet s'articulera en plusieurs étapes

-une première étape visant à évaluer les paramètres de pharmacocinétique et de pharmacodynamie des anticorps et à caractériser les populations immunes sanguines et la concentration plasmatique de certains composés des souris CD39KI et CD73KI. Le but est d'optimiser dans les étapes ultérieures d'efficacité les protocoles d'administration des anticorps.

-une seconde étape visant à évaluer l'éventuelle toxicité du blocage des enzymes CD39 et CD73.
-dans une troisième étape, l'efficacité anti-tumorale de l'anticorps anti-CD39, seul ou en combinaison avec d'autres protocoles thérapeutiques de référence (immuno ou chimiothérapies) sera évalué sur des souris ayant été greffées avec des cellules tumorales par voie sous-cutanée, intraveineuse ou orthotopique. Les points limites (fixés sur la base de la grille d'évaluation de la souffrance de MORTON et GRIFFITHS 1985 modifiée) relatifs à la perte de poids, à l'apparence et aux volumes des tumeurs (nécrose, volume $\geq 1500 \text{ mm}^3$), à l'apparence et à l'activité des animaux (prostration, poils piqués, isolement, difficultés respiratoires, paralysie...) sont des critères qui justifieront le sacrifice des animaux. Le nombre d'animaux inclus dans ce projet est évalué à 13842 sur 5 ans.

15648 Le but de ce projet est la mise en place d'un élevage de souris atteintes de collagénopathies de type 2 (pathologie du cartilage entraînant une croissance anormale) dans le but de mettre en place des modèles expérimentaux utilisant ces souris permettant de développer notamment de nouvelles thérapies car il n'existe actuellement pas de traitement pour cette pathologie.

Nous utiliserons dans ce projet des souris qui présentent la même pathologie que celle exprimée chez l'homme. Il s'agit d'une souche à phénotype dommageable (troubles de la locomotion, troubles respiratoires, hydrocéphales...). Ce projet est nécessaire afin de générer des animaux qui seront par la suite utilisés dans d'autres projets d'expérimentation animale tels que développement de nouveaux traitements pour la SEDC (spondylo epiphysaire dysplasie congénitale), la collagénopathie de type 2

Ce projet aura de potentiels bénéfiques pour l'Homme. À l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement pour cette pathologie. Maintenir un élevage de ces souris permettra de faire des tests de traitement sur ces animaux atteints de collagénopathie de type 2.

Afin de satisfaire aux exigences de la règle des 3R, nous avons mis en place différentes stratégies pour ce projet

-Dans un objectif de Raffinement, les femelles homozygotes ne sont pas mises en croisement car, du fait de leur phénotype, il leur est très difficile de mener à terme une gestation sans danger pour leur vie. De plus, des points limites précoces ont été établis afin de réduire au maximum la potentielle souffrance des animaux utilisés dans ce projet.

-Dans un objectif de Réduction, l'expérimentation se déroule avec un maintien d'une petite cohorte d'animaux en permanence et l'augmentation du nombre d'animaux seulement en cas de besoin de générer des géniteurs nécessaires pour d'autres procédures expérimentales.

-Dans le cadre de ce projet le Remplacement n'est pas possible à ce jour. Cependant dans le cadre de développement de nouvelles thérapies, les études *in vivo* sont toujours précédées d'études *in vitro* permettant de réduire par la suite le nombre d'animaux utilisés. Enfin, les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées dans ce projet sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux.

Nous estimons que nous allons utiliser au maximum 11160 souris sur 5 ans.

15649 L'utilisation d'antibiotiques a révolutionné la médecine moderne. Cependant, l'émergence de résistances aux antibiotiques, plus rapide que le développement de nouveaux antibiotiques, est à l'origine d'un problème de santé publique. Une seconde limitation liée à l'utilisation d'antibiotiques traditionnels réside dans leurs larges spectres d'action impliquant la mort de nombreuses espèces bactériennes incluant celles qui nous sont bénéfiques.

Dans ce contexte, il existe un besoin urgent de développer des thérapies ciblées permettant un contrôle précis des écosystèmes microbiens complexes.

Dans cette optique, le projet vise à utiliser une nouvelle technologie antimicrobienne basée sur l'utilisation d'un dérivé des bactériophages (ciblant exclusivement certaines espèces bactériennes) transportant des « ciseaux moléculaires » qui, une fois à l'intérieur des bactéries, vont scanner leur

matériel génétique et trouver la séquence à couper pour laquelle ils ont été « programmés ». Ainsi seules les bactéries possédant la séquence d'ADN ciblées seront tuées, sans affecter le reste du microbiote.

Les bactéries d'intérêts dans ce projet sont des *Escherichia coli* (*E. coli*) entérohémorragiques (peuplant le système digestif et responsable d'hémorragies) productrices de Shiga-toxine (EH-STEC). Ces bactéries sont à l'origine de maladies rares mais graves en particulier chez les jeunes enfants chez qui elles induisent des diarrhées hémorragiques et une atteinte rénale sévère.

Le modèle animal utilisé pour cette étude sera le jeune lapin compte tenu de sa capacité similaire à l'homme à développer une diarrhée.

48 lapins seront nécessaires à cette étude.

La mise en place de ce projet s'est attachée à respecter la règle des 3R

Remplacer Une partie des résultats préliminaires a été obtenue *in vitro* mais la complexité d'un être vivant ne peut pas être mimée en laboratoire nécessitant l'utilisation de modèles animaux.

Réduire Un minimum de 4 lapins sera utilisé pour le perfectionnement de la procédure afin que chaque membre de l'équipe soit apte à la réaliser. Seulement 3 lapins par groupe seront ensuite utilisés pour les phases de sélection de souches bactériennes et d'efficacité du composé antimicrobien, ce qui correspond au minimum nécessaire à l'obtention de résultats statistiquement interprétables. Ces phases seront répétées une seule fois pour s'assurer de la reproductibilité des résultats.

Raffiner Les animaux seront hébergés dans un environnement adapté et enrichi. La majorité des actes sera réalisée sous anesthésie générale (intubation oro-gastrique et la plupart des prélèvements sanguins) afin de limiter au maximum le stress et la souffrance des animaux.

15650 La cardiomyopathie dilatée (CMD) est la cause la plus fréquente d'insuffisance cardiaque chez les sujets jeunes (18-45 ans) et la cause la plus fréquente pour la transplantation cardiaque en France. Il s'agit d'un affaiblissement du muscle ventriculaire, résultant en une diminution de la contraction du muscle cardiaque et donc en un manque d'oxygénation des organes. Malheureusement, il n'y a pas de thérapie efficace pour traiter la CMD. Le cœur est un organe métaboliquement exigeant et les mitochondries sont primordiales pour la survie et l'activité des cellules musculaires cardiaques). Les mitochondries sont des organites intracellulaires dont la fonction principale est de fournir aux cellules l'énergie dont elles ont besoin pour assurer leur survie et les fonctions qu'elles sont censées accomplir. Certaines questions d'intérêt scientifique nécessitent des expériences sur les animaux mais nous utiliserons aussi deux procédures alternatives lorsque c'est possible : expériences sur les cellules humaines disponibles et cellules animales (souris) maintenues en culture, et l'exploration de certains mécanismes par simulation informatique. Néanmoins, nous ne pouvons pas étudier la physiopathologie des maladies cardiovasculaires *ex vivo* car les phénomènes sont multifactoriels. Les modèles d'animaux sont nécessaires pour évaluer *in vivo* au cours de plusieurs mois le développement des altérations pathologiques propres aux organes en question. Nous avons généré deux modèles murins dans lesquels la protéase mitochondriale Yme1l (cYKO) ou la protéine d'échafaudage Mtp18 (cMKO), protéines multifonctionnelles impliquées dans l'homéostasie mitochondriale, sont spécifiquement bloquées dans les cellules musculaires cardiaques adultes, ce qui cause un dysfonctionnement mitochondrial. Ces modèles murins reproduisent tous les signes pathologiques de la CMD défaillance de la fonction cardiaque, perte de poids ainsi qu'une mort précoce. Un remodelage métabolique cardiaque caractérisé par une augmentation de la consommation cardiaque de glucose ainsi qu'une réponse inflammatoire a été impliqués dans nos modèles et nous visons donc à tester si l'inhibition de l'un ou l'autre peut prévenir la CMD. L'hypothèse de travail est que la consommation cardiaque de glucose trop élevé et/ou l'inflammation induisent la maladie cardiaque. Au vu des résultats encourageants, nous proposons de mettre en place des nouveaux modèles murins dans lesquels nous 1) limitons la consommation cardiaque de glucose par inhibition du transporteur principal Glut4 dans nos modèles de la CMD et 2) limitons l'inflammation cardiaque par inhibition des gènes pro-inflammatoire Tmem173 et Ifnar1 ou par traitement avec des molécules antioxydantes (MitoQ) ou anti-inflammatoire (sodium

salicylate) afin de mieux comprendre le rôle du glucose et de l'inflammation dans le développement des pathologies cardiaques. L'étude de ces modèles au cours du temps (état clinique) nous permet de mieux comprendre les processus mis en cause afin d'envisager des voies d'intérêt thérapeutique dans l'avenir. De plus, ces modèles de souris représentent des outils de choix pour tester des molécules pharmacologiques afin de ralentir ou inverser les processus pathologiques. Six procédures expérimentales seront utilisées de classe légère à classe modérée. Nous nous efforçons de raffiner nos expérimentations et de réduire toutes les souffrances inutiles à l'animal. Pour ce qui est de la gestion de la douleur, nous effectuons un suivi rigoureux et régulier et utilisant des analgésiques quand cela est nécessaire. Avec l'aide des statisticiens, et en tenant compte des règles gouvernant la significativité statistique, nous avons réduit, le nombre de souris utilisées dans chaque procédure expérimentale au minimum nécessaire. Le respect de la règle des 3R est en particulier assurée par la conception et la mise en œuvre expérimentales l'analyse de paramètres multiples chez chaque animal, l'obtention d'animaux contrôles et mutants dans les mêmes croisements, l'utilisation de tests statistiques adaptés ainsi que le suivi quotidien et le respect des points limites. Cette étude est prévue sur cinq ans et nécessitera au total 483 souris mâles et femelles âgés de 10 à 52 semaines et utilisées dans les procédures pendant cette période 40 animaux dans une procédure modérée et 443 animaux dans 5 procédures légères.

15651 Mots clés oncologie préclinique – pharmacocinétique

Buts du projet Les modèles animaux permettent l'étude des effets positifs et négatifs de drogues anticancéreuses à l'échelle de l'organisme. Ces études précliniques sur l'animal permettent la validation de thérapies anticancéreuses plus efficaces pour le traitement des patients.

Les études proposées visent à déterminer la durée de présence dans le sang de l'animal de nouvelles molécules développées pour être des traitements anticancéreux contre les cancers du sein. Connaître ces paramètres pour un composé permet de déterminer sa fenêtre d'efficacité, et donc de déterminer la dose à utiliser. Les études proposées portent sur différents variants d'un anticancéreux en développement et visent à déterminer lequel a paramètres pharmacocinétiques les plus favorables, afin de le qualifier pour un développement préclinique plus poussé.

Les premiers essais de ces candidats médicaments ont été réalisées sur des cellules en culture, mais la nécessité de connaître leur durée de présence dans le sang nécessite la réalisation d'expérimentation sur un modèle animal reproduisant autant que possible la pathologie et la physiologie humaine. Le choix du rat se justifie par le fait que c'est le modèle obligatoire pour des études de pharmacologie réglementaires et parce que cette étude requiert des prélèvements sanguins répétés qui nécessiterait un plus grand nombre d'animaux si le modèle souris était utilisé.

Ce projet nécessitera sur 5 ans au maximum 240 rats.

Prise en compte des 3 R

A. Remplacement cette étude vise à déterminer la durée de présence de nouvelles molécules dans le sang d'un organisme vivant, nécessitant ainsi l'utilisation d'un modèle animal. Des études *in vitro* ont été faites en amont afin de sélectionner uniquement les molécules ayant le plus grand intérêt thérapeutique pour les études *in vivo*.

B. Réduction Le choix du rat versus la souris permet d'utiliser un nombre plus restreint d'animaux pour pouvoir réaliser des prélèvements sanguins répétés. Nous avons choisi des effectifs permettant une analyse statistique pertinente et une reproductibilité des résultats tout en réduisant au maximum le nombre d'animaux, à savoir 10 rats par groupes.

C. Raffinement Avant le début des procédures, les rats seront habitués aux expérimentateurs des études, afin de pouvoir réduire, supprimer ou soulager leur stress et leur détresse. Des points limites adaptés comme une surveillance quotidienne, des pesées régulières, un traitement antalgique, ont été définis pour détecter et minimiser toute souffrance, toute douleur et tout stress des animaux.

15652 Les hormones thyroïdiennes sont primordiales pour le bon fonctionnement de l'organisme, autant pendant le développement foetal que la vie adulte. Elles régulent notamment le neurodéveloppement durant la vie foetale, et le maintien de fonctions vitales, comme la

thermogénèse, à l'âge adulte. Ces hormones agissent dans presque tous les tissus de l'organisme. Les perturbations de cette signalisation entraînent des conséquences délétères sur la santé des individus hypothyroïdie, problèmes de développement cérébral, déficit intellectuel. Les hormones thyroïdiennes agissent en activant ou en inhibant la transcription de gènes cibles. Toutefois, ces gènes-cibles sont globalement mal connus et ne sont pas les mêmes d'un tissu à l'autre. Le manque de compréhension des mécanismes d'action des hormones thyroïdiennes freine le développement de traitements adaptés aux différentes pathologies associées.

Ce projet consiste à déterminer les gènes cibles des hormones thyroïdiennes dans différents tissus chez la souris. La signalisation thyroïdienne est étudiée en partie sur des modèles *in vitro* (culture cellulaire), mais aucun modèle *in vitro* ne permet de reproduire la complexité des interactions cellulaires mises en jeu au niveau de l'organisme entier. C'est pourquoi l'expérimentation animale reste une source d'informations irremplaçable. La souris sera utilisée car il s'agit d'un bon modèle, la signalisation thyroïdienne dans cette espèce étant similaire à celle chez l'homme. De plus, nous utilisons des modèles de souris génétiquement modifiées permettant d'identifier les gènes cibles dans un type cellulaire donné, ce qui est très utile pour étudier le fonctionnement de tissus composés de types cellulaires variés, comme le cerveau.

Le projet consistera à activer la signalisation thyroïdienne par des traitements pharmacologiques chez ces souris génétiquement modifiées, qui ne présentent pas de phénotype dommageable. Les traitements seront appliqués d'une part sur des souris adultes pour étudier les mécanismes d'action des hormones thyroïdiennes dans la régulation de la dépense énergétique, et d'autre part sur des femelles gestantes et des souriceaux pour étudier les mécanismes d'action des hormones thyroïdiennes au cours du développement du cerveau.

Ce projet nécessitera 2164 souris au maximum. Ce nombre inclut des souris supplémentaires, notamment pour pallier à l'inclusion probable de femelles non gestantes. L'estimation du nombre d'animaux nécessaires tient également compte des aléas des techniques utilisées pour étudier l'expression des gènes, ainsi que de la variabilité inter-individuelle. Enfin, nous avons prévu des souris supplémentaires pour répondre à des demandes de collaboration sur nos modèles animaux. Il est probable que le nombre maximal de souris prévu ne sera pas atteint, car il prévoit également une possibilité de répétition des expériences en cas d'imprévu.

Les souris seront examinées avec soin durant toute la phase expérimentale. Les traitements pharmacologiques prévus sont bien décrits dans la littérature et n'induisent pas de signe de souffrance. Des points limites adaptés ont cependant été définis afin d'éviter toute souffrance inattendue.

15653 Le cancer du pancréas est au 5ème rang des causes de mortalité par cancer dans le monde. Environ 14 000 nouveaux cas apparaissent chaque année. Le diagnostic est souvent réalisé à un stade avancé du fait d'une expression clinique tardive de la maladie. Seuls 20% des patients sont diagnostiqués à un stade où la tumeur est résécable par chirurgie. Tous stades confondus, la survie à 5 ans est de seulement 5%. Les traitements proposés actuellement sont la chimiothérapie et la radiothérapie. Ces traitements, qui induisent des effets secondaires importants ne permettent pas de guérir ce cancer. Notre objectif est de développer une thérapie basée sur l'utilisation de nanoparticules d'or comme potentialisateur de la radiothérapie. En effet, ces matériaux ont l'avantage de pouvoir interagir avec les rayonnements X émis lors de la radiothérapie, ce qui génère des rayonnements X secondaires augmentant ainsi la dose délivrée au niveau des tissus dans lesquels sont présentes les nanoparticules. Les nanoparticules d'or ont déjà été utilisées et elles sont bien tolérées par l'organisme. Par ailleurs, de manière à avoir une synthèse « verte », elles sont synthétisées à base d'extraits de plantes endémiques. Plusieurs nanoparticules ont été synthétisées et ont été évaluées *in vitro* (cytotoxicité, internalisation, activité anti-tumorale) sur des lignées tumorales d'adénocarcinomes pancréatiques (PDAC) afin de ne retenir que les nanoparticules présentant une activité anti-tumorale importante à une dose non cytotoxique. Ces tests *in vitro* représente une première étape importante mais qui ne suffit pas à valider une molécule, en effet, une tumeur ne se résume pas à des cellules tumorales, il y a aussi tout le microenvironnement tumoral à prendre en compte. C'est pourquoi il est nécessaire de tester ces

molécules sur un modèle *in vivo* qui se rapproche le plus possible de la situation clinique. Afin d'obtenir ces modèles, la solution la plus utilisée consiste à injecter des cellules humaines tumorales issues de patients à des souris immunodéprimées (de manière à ce que leur système immunitaire ne rejette pas la greffe tumorale). Dans le cas présent, des cellules humaines Mia-PaCa-2 (une des lignées cellulaires les plus utilisées pour le modèle de PDAC pour l'évaluation de thérapies) seront injectés en sous cutanées à des souris Balb/c nude. Avant de pouvoir utiliser ces modèles pour évaluer une thérapie, il est important de les caractériser (taux de prise de greffe, courbe de croissance tumorale, réponse au traitement de référence...), ainsi le nombre d'animaux a utilisé pourra être clairement établi ainsi que le temps auquel injecter le traitement et les points limites c'est l'objectif de cete étude qui est donc juste une étude préliminaire avant de pouvoir utiliser le modèle pour l'étude de nouveaux agents thérapeutiques. Afin de respecter la règle des 3R, le nombre d'animaux a été réduit au minimum nécessaire pour acquérir les informations souhaitées, c'est-à-dire 5 souris par groupe avec 3 groupes (un groupe contrôle, un groupe traité avec le traitement de référence FOLFIRINOX et un groupe traité avec une dose plus faible du traitement de référence) soit 15 souris au total. La prolifération tumorale sera évaluée par la mesure des tumeurs au pieds à coulisse. En fin d'étude, les animaux seront utilisés dans le cadre d'une seconde procédure, visant là encore à préparer les études suivantes. Cette procédure visera à évaluer la tolérance des souris porteuses de tumeurs à un traitement avec des nanoparticules couplées à des séances de radiothérapie. Ainsi le schéma thérapeutique de l'étude d'efficacité pourra être optimisé pour induire le moins d'effets néfastes possibles sur les animaux.

Respect de la règle des 3R

Remplacement Des tests cellulaires ont été réalisés en amont.

Réduction Le nombre d'animaux a été réduit au minimum nécessaire pour acquérir les informations souhaitées, c'est-à-dire 5 souris par groupe soit 15 souris au total. Utilisation des mêmes souris pour évaluer la tolérance au traitement nanoparticules + radiothérapie.

Raffinement L'injection des cellules se fera sous anesthésie. Le suivi du volume tumoral et du poids permettra d'interrompre l'étude si les volumes tumoraux atteignent 1000mm³ ou si la perte de poids dépasse les 20% du poids initial. Enfin les animaux seront surveillés quotidiennement pour détecter tout inconfort lié au protocole.

Dommmages/Avantages L'étude sur ce nombre restreint d'animaux permettra de bien maîtriser le modèle (vitesse de croissance, taux de prise de greffe, dose à injecter pour le traitement de référence, effet d'une séance de radiothérapie) afin de pouvoir mener les études suivantes sur le nombre minimum d'animaux nécessaire et avec d'emblée le protocole le plus pertinent.

Le passage par le modèle *in vivo* est pour l'instant inévitable pour tester de nouvelles thérapies, mais en caractérisant le modèle en amont cela permettra lors des prochaines études sur ces modèles, lorsque des candidats médicaments auront été retenus, de ne pas utiliser plus de souris que nécessaire, de maitriser complètement le protocole de greffe et de suivi et de déterminer des points limites de manière à ne pas induire de souffrance chez l'animal.

15654 La schizophrénie est une maladie psychiatrique chronique fortement invalidante qui se déclare généralement entre 15 et 25 ans. Sa fréquence (environ 1% de la population générale) et ses conséquences majeures sur la vie personnelle, sociale, et professionnelle des patients et de leur entourage en font un véritable enjeu médical et socioéconomique. La connaissance des mécanismes physiopathologiques impliqués dans la schizophrénie reste limitée, notamment en raison de la complexité des interactions entre facteurs de risque génétiques et environnementaux sur le développement normal du système nerveux central (SNC) lors de sa formation in utero jusqu'à sa maturation à l'adolescence. Mieux appréhender l'impact de ces différents facteurs est un enjeu majeur dans la recherche de nouvelles thérapies et méthodes de prévention. Nous avons montré l'existence d'une dérégulation de la Neuropiline 1, chez des patients ayant développé une schizophrénie à l'adolescence. Cependant, les fonctions de la neuropiline lors de la maturation du cerveau à l'adolescence et ses interactions avec la prise de cannabis (facteur de risque pouvant précipiter le développement de la schizophrénie) n'ont pas encore été élucidées.

Ce projet propose d'étudier le rôle de la Neuropiline 1 au niveau de 2 populations cellulaires (neurones et microglie) lors du développement du SNC et lors de la prise de cannabis à l'adolescence à l'aide d'un modèle animal afin de tester sa possible implication dans la physiopathologie de la schizophrénie.

Nous prévoyons d'utiliser au maximum 2184 souris sur 5 ans.

Notre projet mettra en jeu des procédures chirurgicales, d'administration de substances pharmacologiques avant étude physiologique (imagerie fonctionnelle par ultra-sons, électrophysiologie) ou anatomique et une évaluation des comportements s'apparentant à l'anxiété, la psychose et des fonctions cognitives à l'aide de différents tests comportementaux. Cette étude qui nécessite une approche comportementale n'est possible qu'à l'échelle de l'organisme entier et ne peut être reproduite *in vitro* ni *ex vivo*.

Ce projet s'effectuera dans le respect de la règle des 3R, en veillant au bien-être des animaux et en limitant leur douleur. Pour réduire le nombre d'animaux, nous avons estimé la taille des échantillons permettant une analyse statistique efficace des résultats grâce aux données collectées au cours d'expériences précédentes. Pour éviter toute souffrance les procédures de chirurgie et de prélèvement se feront sous anesthésie générale avec prise en charge de la douleur. Les animaux seront observés quotidiennement et évalués à l'aide de points limites bien définis.

Les résultats attendus permettront d'améliorer l'évaluation des risques de développer une schizophrénie chez les adolescents présentant des difficultés psychiques et d'adapter la prise en charge. Par ailleurs, la meilleure compréhension moléculaire et cellulaire du déclenchement de la schizophrénie permettra d'envisager des soins spécifiquement adaptés à ces sujets et à visée préventive.

15655 L'élasticité est une propriété majeure des grosses artères permettant le lissage du flux sanguin discontinu et pulsatile sortant du cœur, et donc une perfusion continue des tissus. Les fibres élastiques responsables de l'élasticité artérielle sont composées à 90% d'élastine et à 10% de microfibrilles riches en fibrilline-1. Toute perte d'élasticité artérielle -due à une dégradation mécanique ou enzymatique des fibres élastiques- a des conséquences délétères majeures sur la fonction cardiaque, la pression sanguine, l'hémodynamique et la perfusion des organes. Ces altérations des fibres élastiques et dysfonctions associées sont observées dans le vieillissement normal, et dans les maladies génétiques liées à une production ou une organisation anormale des fibres élastiques. Ces situations incluent le syndrome de Williams-Beuren et la sténose aortique supra-valvulaire (qui induisent des rétrécissements artériels) et le syndrome de Marfan (qui induit des anévrismes).

Le projet consiste à introduire, par injection intraveineuse dans la veine caudale de souris génétiquement modifiées présentant des dégradations des fibres élastiques artérielles, une protéine synthétique, dont la structure et la fonction sont dérivées de celles de l'élastine native. Par la suite, l'intégration de cette protéine dans les fibres élastiques dégradées de la paroi des artères sera analysée et sa capacité à améliorer l'élasticité artérielle, et donc les fonctions artérielle et rénale, sera évaluée. L'analyse de la fonction artérielle sera évaluée *ex vivo* (suite à la mise à mort de l'animal). L'analyse de la fonction rénale sera réalisée sous anesthésie profonde à la fin de cette dernière analyse les animaux seront mis à mort et les tissus d'intérêt collectés. Ces expériences seront réalisées chez la souris génétiquement modifiée adulte (6 mois) ou âgée (24 mois) présentant diverses pathologies artérielles et leurs témoins.

Les résultats obtenus sur ces modèles de souris permettront de vérifier l'efficacité de la protéine synthétique dans le maintien ou l'amélioration de l'élasticité artérielle et des paramètres physiologiques associés et serviront à ouvrir la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Notre projet inclut la règle des 3R

- Remplacer En préambule de ce projet, différents travaux ont été réalisés *in vitro* sur des cellules endothéliales, cellules musculaires lisses et fibroblastes qui sont les principales cellules composant les artères. Par ailleurs, une étude précédente a été menée sur les embryons de poissons zèbres de manière à valider la non-toxicité de la protéine synthétique dans un organisme vivant. Ce projet

visé à analyser la mécanique et la réactivité vasculaires suite à l'administration d'un composé synthétique. Ces paramètres étudiés reposent sur une interaction fonctionnelle entre les systèmes nerveux et vasculaires, ainsi qu'une interaction entre les signaux circulants et les différents types cellulaires vasculaires, aussi bien que sur l'interaction entre les différents types de cellules vasculaires structurées de manière très précise dans la paroi. L'utilisation de simples modèles cellulaires ne permettrait pas de répondre à nos questions. Par ailleurs, bien qu'en progression constante, la recherche sur la reconstruction d'un rein à partir de cellules souches pluripotentes n'est qu'à ses débuts et ne permet pas aujourd'hui de reproduire le réseau vasculaire à l'équivalent de cet organe. Aucune méthode alternative ne peut donc se substituer à l'utilisation des animaux pour la réalisation de ce projet.

- Réduire Le nombre de souris nécessaire à nos travaux a été réduit au minimum sans compromettre l'interprétation statistique de nos résultats 10 animaux par groupe sont prévus.

- Raffiner Ce projet est un travail collaboratif entre 2 laboratoires universitaires. Les animaux concernés par ce projet seront élevés dans le laboratoire partenaire qui a une parfaite connaissance des caractéristiques zootechniques des lignées de souris utilisées. Quinze jours avant l'âge requis (6 mois pour les souris adultes ou 24 mois pour les souris âgées) et donc 11 jours avant le début de la procédure expérimentale, les animaux seront transportés par un transporteur agréé dans notre établissement utilisateur et surveillés de manière journalière et pesés de manière bi-hebdomadaire pendant la période d'acclimatation afin de vérifier l'absence d'impact du transport sur le bien-être animal. Des points limites ont été clairement définis avec le laboratoire partenaire afin de détecter précocement tout signe d'inconfort ou de souffrance. En cas d'atteinte d'un point limite, l'animal sera immédiatement mis à mort. Les conditions de l'hébergement de longue durée des animaux en vieillissement, destinés à être utilisés à l'âge de 24 mois, seront particulièrement surveillées afin de limiter au maximum les risques de décès spontané liés à l'âge. Des mesures particulières d'organisation des cages et des animaux dans les cages seront prises.

Ce projet de 5 ans concernera 320 souris.

15656 La microchirurgie est une discipline chirurgicale qui permet de réparer, de remplacer, de greffer des nerfs ou des vaisseaux, et qui permet de disséquer des tumeurs cérébrales et de réaliser une hémostase rigoureuse et délicate dans un cerveau ou une moelle épinière.

Son exercice n'est accessible qu'à un chirurgien rompu aux différentes techniques microchirurgicales, et dont la pratique est quotidienne. Tous les chirurgiens des centres SOS mains notamment en France exercent cette spécialité. Tous les Neurochirurgiens sont formés à la microchirurgie, comme la plupart des chirurgiens qualifiés en chirurgie plastique et reconstructrice. Cette compétence s'acquiert par ce diplôme universitaire de microchirurgie dans le cadre de la formation initiale du chirurgien.

Le diplôme Universitaire de microchirurgie s'adresse à des chirurgiens en formation (vétérinaires ou internes des services de chirurgie) et permet à ceux-ci d'acquérir la technique, les compétences et le diplôme nécessaire pour pratiquer la chirurgie réparatrice des microvaisseaux.

Pour acquérir ces gestes, il est indispensable de travailler sur des vaisseaux avec du sang circulant pour pouvoir apprendre à réparer ces veines et artères de manière à ce que celles ci soient à nouveau opérationnelles sans hémorragie et sans thrombose.

L'utilisation d'animaux vivants est donc indispensable.

Tous les travaux pratiques se feront sous la responsabilité d'une personne possédant le niveau de conception des procédures expérimentales et le diplôme d'école de chirurgie expérimentale.

Ce DU sera proposé à un maximum de 16 participants par an. 9 séances de travaux pratiques sur animal sont prévues dans le programme. Il est donc envisagé d'utiliser un maximum de 160 rats par an compte tenu des éventuels accidents d'opération et de l'éventuel examen de rattrapage soit 800 rats maximum pour une période de 5 ans.

Cette formation permettra l'apprentissage sur 3 types de tissus (vasculaire, nerveux et utérus). Les 3 types de tissus feront l'objet d'une procédure expérimentale détaillée indépendamment.

L'ensemble des procédures pourront être appliquées au même animal permettant ainsi d'en réduire fortement le nombre.

Les participants de ce DU reçoivent au préalable une formation de microchirurgie sur du matériel inerte (nouilles chinoises "shirataki") afin de limiter au maximum le nombre d'animaux ceci afin de respecter au mieux la règle des 3 R.

Le choix de la souche et le sexe des rats utilisés est sans conséquence sur la qualité de l'enseignement ce qui permet d'utiliser en priorité des animaux des élevages internes de notre établissement ainsi que des animaux sans intérêt pour les protocoles de recherche. Toutefois, si le besoin s'en faisait sentir, nous pourrions avoir besoin de compléter les lots par des achats de rats SPRAGUE DAWLEY chez un fournisseur agréé.

Les rats seront maintenus avant leur intégration aux procédures dans une pièce climatisée, ventilée, à l'hygrométrie contrôlée par groupe de 5 individus dans des cages enrichies.

Ils seront préanesthésiés par induction d'isoflurane (5%) dans une cage d'endormissement puis anesthésiés par injection intrapéritonéale d'un mélange kétamine (100mg/kg) /xylazine (10mg/kg). Le niveau d'anesthésie sera évalué tout au long du protocole par surveillance visuelle du rythme respiratoire et par pincement à la base de la queue. En cas, de signe de réveil, l'animal se verra injecter une 1/2 dose de kétamine en intrapéritonéal. A la fin de procédures, les rats seront mis à mort par injection intraveineuse létale de pentobarbital (30mg/kg).

Etant donné l'objectif de ce projet, aucun test statistique n'a été envisagé concernant les animaux.

Le nombre d'animaux est réduit à son minimum (1 rat par séance par participant). Plusieurs vaisseaux seront utilisés sur le même animal permettant également d'en réduire le nombre.

La formation débutera par 5 séances théoriques portant sur la microchirurgie (matériel, méthodes), l'anatomie du rat et sur l'expérimentation animale en insistant sur les parties réglementation, bien-être animal et règle des 3 R.

La première séance pratique se déroulera entièrement sur du matériel inerte (nouilles chinoises "shirataki") afin d'assimiler puis de valider les gestes techniques avant d'appliquer ceux-ci sur les animaux. L'ensemble des séances suivantes débutera par du travail sur matériel inerte sur lequel le geste technique devra systématiquement être validé par le responsable de séance avant de passer sur l'animal.

15657 La mission de notre centre de recherche est de mettre au point des aliments destinés à l'alimentation des lapines en gestation et en lactation et des lapins en engraissement. Au cours de nos essais, nos principales mesures sont d'ordre zootechnique consommation d'aliments, évolution du poids, évolution de l'état corporel et suivi sanitaire. Afin d'approfondir nos essais, nous pouvons être amenés à réaliser des prélèvements sanguins sur les lapines, les lapereaux et les lapins en engraissement pour compléter nos mesures classiques et pour évaluer l'impact de la nutrition sur plusieurs métabolismes (reproduction, santé, immunité...). Les interactions complexes entre métabolismes ne permettent pas d'utiliser de méthodes alternatives à la prise de sang. Le sang sera prélevé par simple ponction à la veine marginale de l'oreille ne provoquant pas de douleur et collecté par capillarité. Les procédures sont de classe légère puisque le volume prélevé est très faible pour les lapines (2% du volume sanguin par prélèvement), faible pour les lapins en engraissement (de 4.5% à 2% du volume sanguin par prélèvement en fonction de l'âge) et pour les lapereaux (de 9.7% à 4.5% du volume sanguin par prélèvement en fonction de l'âge). La durée de la prise de sang est très rapide du fait du très faible volume prélevé. Les prises de sang sont réalisées sur un échantillon limité d'animaux déterminé par une analyse statistique préalable. Ainsi des prises de sang seront effectuées sur 400 lapines, 400 lapereaux et 500 lapins en engraissement sur les 5 ans. Pour les lapines, le nombre de prélèvements réalisé sur chaque animal est en moyenne de 2 par an. Pour les lapereaux et les lapins en engraissement, c'est en moyenne 1 fois à chaque stade (donc maximum deux prélèvements au cours de la vie de l'animal si l'on considère un animal ayant déjà été prélevé sous la mère).

La contention est réduite au minimum nécessaire pour effectuer le prélèvement sanguin dans les conditions de sécurité pour l'animal et les opérateurs. Les prises de sang sont réalisées par des opérateurs qualifiés, habitués à manipuler les animaux.

Toutes mesures sont prises pour limiter la peur et la douleur des animaux faisant l'objet des prélèvements. Pour un prélèvement rapide limitant le stress du lapin, une contention douce est appliquée. Cette contention est réalisée dans une boîte (adaptée à la taille de l'animal) limitant les mouvements du lapin, dans une obscurité rassurante et laissant juste sortir l'oreille à prélever.

A la fin de chaque essai, les lapines, les lapereaux et les lapins en engraissement continuent leur cycle d'élevage classique.

15658 Le lupus est une maladie auto-immune qui touche principalement des femmes (90%) en âge d'enfanter. Le lupus peut toucher les reins, la peau, les articulations et d'autres organes. Aucun traitement spécifique n'existe encore contre cette maladie et les patients sont traités avec des fortes doses de corticoïdes et d'immunosuppresseurs ayant des effets secondaires importants.

Le projet vise à décrire comment la maladie se développe et à valider des cibles thérapeutiques précédemment identifiées pour le lupus érythémateux systémique.

Les mécanismes du développement du lupus sont très complexes et impliquent toutes les cellules du système immunitaire. L'implication des basophiles, des cellules immunitaires connues pour leur implication dans les allergies, dans l'amplification du lupus est liée à l'importance d'un lipide, la prostaglandine D2 (PGD2), qui les active au cours des poussées de la maladie, tant dans des modèles murins de lupus que chez les patients lupiques. Des souris lupiques chez qui on bloque les récepteurs de la PGD2 voient leur maladie grandement diminuée. De plus, la source principale de PGD2 au cours de la maladie n'est pas connue et pourrait constituer une cible thérapeutique permettant de prévenir les poussées de la maladie.

Chez l'Humain, les poussées de la maladie peuvent être induites par une exposition au soleil (photosensibilité). Cette exposition entraîne une affection cutanée (en masque de loup sur le visage, d'où « lupus ») qui précède une poussée globale de la maladie, même au niveau rénal.

Les mastocytes sont des cellules immunitaires également connues pour leur implication dans les maladies allergiques. Ces cellules sont nombreuses dans la peau et sont des producteurs majeurs de PGD2, notamment après exposition aux UV. Nous voulons savoir si l'exposition aux UV solaires des patients entraîne une production de PGD2 par les mastocytes de la peau, et si cette source de PGD2 active les basophiles induisant alors une poussée de la maladie.

Notre projet étudiera

- 1- L'amplification de la maladie induite par l'exposition aux UVB solaires.
- 2- L'implication des mastocytes et de la PGD2 dans l'induction de poussées de la maladie.
- 3- Les interactions cellulaires mastocytes/basophiles dans les mécanismes de ces poussées et les autres cellules du système immunitaire responsables de la poussée au niveau rénal.

De par la complexité des maladies étudiées, il n'existe aucune alternative à l'utilisation de modèles animaux développant eux-mêmes la maladie. Ces animaux permettront de valider les nouvelles cibles thérapeutiques identifiées afin de transférer nos découvertes aux patients.

Nous devons valider nos hypothèses dans deux modèles murins distincts de lupus. L'un de ces modèles est spontané (souris Lyn^{-/-}) et l'autre est induit (injection intrapéritonéale d'une huile minérale appelée Pristane). Le déclenchement de la maladie induite par une exposition aux UVB sera testé dans ces deux modèles. Afin de démontrer le rôle des mastocytes dans ce modèle, nous utiliserons des souris qui n'ont pas de mastocytes. Afin de valider le rôle des mastocytes via leur production de PGD2, ces souris seront injectées avec des mastocytes normaux ou déficients pour l'enzyme responsable de la production de PGD2 (HPGDS^{-/-}). Les interactions des basophiles avec d'autres cellules du système immunitaire seront testées avec des souris déficientes en basophiles ou déficientes spécifiquement dans les basophiles pour certaines molécules.

Ces modèles de maladie lupique ne sont pas connus pour induire un stress ou une douleur soutenus des animaux.

Les interventions sur les animaux concernés se limiteront aux actes suivants :

- prélèvements sanguins sur animaux anesthésiés par voie rétro-orbitale, et collecte d'urines.
- injections de cellules pour reconstituer les souris déficientes en mastocytes (par voie intradermique, intrapéritonéale et intraveineuse) sur animaux anesthésiés.
- Administration de composés thérapeutiques (orale par gavage et cutanée par onction) aux souris (anesthésiées à l'isoflurane pour l'application cutanée, éveillées pour les gavages).
- Exposition aux UVB, à des doses contrôlées, des souris anesthésiées concernées à l'aide de matériel de photothérapie adapté.

Remplacement des modèles animaux Le remplacement dans nos études de l'approche par modèle animaux n'est pas possible pour l'étude des mécanismes des maladies complexes comme le lupus.

Réduction du nombre d'animaux L'étude de cellules humaines *ex vivo* et l'analyse des échantillons de patients permet de réduire les hypothèses de travail et ainsi de limiter le recours aux modèles animaux aux cibles thérapeutiques candidates préalablement identifiées sur des échantillons humains. De plus, une souris contrôle d'une expérience *in vivo* verra ses organes utilisés pour des cultures cellulaires et des expériences *in vitro*.

Notre projet aura une durée de 5 ans et utilisera un maximum de 780 animaux. Le but des études chez la souris est de pouvoir conclure sur la validité de nos hypothèses et d'une approche thérapeutique pour la pathologie humaine. Sur un plan statistique, afin de pouvoir conclure, 5 animaux par groupe expérimental/contrôle sont utilisés. Si, et seulement si, une tendance justifiant d'être confirmée sur un nombre plus important d'individus est constatée, alors le nombre d'animaux par groupe pourra être amené à 10 maximum. Si la significativité statistique est atteinte, nous ne serons pas amenés à augmenter ce nombre.

Raffinement : Aucun traitement induisant la mort ou une souffrance soutenue de l'animal n'est prévu dans le présent projet. Tous les animaux seront observés quotidiennement par le personnel compétent de l'animalerie. Ils sont élevés en conditions standardisées en accord avec la réglementation en vigueur. L'enrichissement de l'environnement des souris dans les cages (cotons de nidification ou tunnels en plastiques...) permet d'optimiser le bien-être des animaux. Les procédures dureront 40 semaines maximum pour le modèle spontané et 8 ou 24 semaines pour le modèle induit. Même si aucune des procédures ne doit induire de souffrance/mal-être manifeste de l'animal, en cas d'observation de tels signes (suivis sur une grille de score) les animaux concernés seront euthanasiés immédiatement.

15659 Ce projet vise à développer des anticorps performants et spécifiques pour la détection de protéines impliquées dans des processus biologiques de base de la cellule, tels que la copie de l'ADN, la transcription et la réparation, la biologie neuronale ainsi que la formation des gamètes. Ces processus sont actuellement mal compris et font l'objet d'une recherche fondamentale validée et financé par plusieurs instances nationales et européennes. L'étude du vivant nécessite des outils moléculaires visant à identifier les protéines dans leur milieu naturel, c'est-à-dire la cellule ou les organes, afin de comprendre leur biologie et leur fonctionnement. Les anticorps constituent un outil de choix pour ces études, car ils permettent d'identifier une protéine parmi des milliers grâce à leur haute spécificité de reconnaissance. Beaucoup de ces anticorps ne sont pas à ce jour disponibles dans le commerce, ni dans d'autres laboratoires de recherche. D'où la nécessité de pouvoir produire des anticorps dirigés contre des protéines de choix. A long terme, ces anticorps pourront également servir d'outil diagnostique pour la détection de protéines dans des cancers ou pour dépister des maladies génétiques.

Nécessité du recours à l'animal

A ce jour, la production d'anticorps ne peut pas se faire sans l'utilisation de l'animal. Le lapin est l'animal le plus communément utilisé pour la production d'anticorps parce qu'il est facile à manipuler et à saigner et que, pour la plupart des applications, il produit des volumes suffisants d'antisérum à titre élevé et à forte affinité. De plus, le recours au lapin est peu coûteux et nécessite peu d'investissement humain. Pour chaque protocole d'immunisation, nous utiliserons 2 lapins, qui

seront injectés avec un même antigène. Ceci est nécessaire afin de compenser d'une part la perte éventuelle d'animaux qui n'auront pas supporté le protocole d'immunisation, et d'autre part les réponses individuelles trop hétérogènes qui conduiront à l'écart des animaux du protocole. Nous utiliserons en total 80 animaux au cours des 5 prochaines années, ce qui permettra le développement d'un total de 40 anticorps dirigés contre 40 protéines différentes.

La règle des 3R sera appliquée selon les modalités suivantes

-Remplacement le recours aux animaux est indispensable car les anticorps polyclonaux ne peuvent pas être produits par d'autres moyens.

Réduction l'utilisation de deux lapins constitue le nombre minimum d'animaux pour espérer d'obtenir un anticorps spécifique.

Raffinement l'hébergement, l'enrichissement et la manipulation des animaux répondent à la réglementation pour le bien-être des animaux (cages aménagées d'une surface minimale de 3 500 cm² et ajout de blocs de bois). Pour les protocoles expérimentaux, afin de réduire la douleur, la souffrance et l'anxiété éventuelle, les animaux seront traités avec des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) par administration orale pendant 5 jours. Lorsque cela est nécessaire, l'animal est manipulé sous anesthésie. Une grille d'évaluation de la douleur avec des points limites spécifiques du protocole est mise en place pour assurer une prise en charge adaptée de l'animale en expérimentation.

15660 Les infections virales constituent un risque sanitaire majeur pour les équidés et provoquent des pertes économiques importantes pour la filière. Malgré des besoins importants, l'arsenal thérapeutique pour lutter contre les infections virales est extrêmement limité, et peut être comparé à l'époque où les antibiotiques n'étaient pas encore disponibles pour lutter contre les infections bactériennes. Le développement de molécules aux propriétés antivirales serait d'une grande utilité pour traiter les animaux atteints de formes sévères ou incurables.

Le virus du Nil occidental ou West Nile virus (WNV) est responsable d'atteintes neurologiques qui peuvent s'avérer mortelles chez le cheval et chez l'homme (il est inscrit sur la liste des dangers sanitaires de catégorie 1 qui recouvrent les dangers pouvant présenter une atteinte grave à la santé publique). Ce virus est transmis par des moustiques et circule dans de nombreux pays européens (dont la France). En 2015, 49 cas ont été rapportés chez des chevaux dans le sud de la France. Des chevaux présents dans des zones où circule ce virus pourraient faire l'objet de traitements antiviraux préventifs à action immédiate pendant la durée de mise en place de l'immunité humorale post-vaccinale ou curatifs s'ils ont été infectés par le WNV car non vaccinés.

Des travaux menés dans le cadre d'un projet antérieur ont permis d'identifier des molécules à activités antivirales *in vitro* contre le WNV sur des modèles de cultures de cellules de derme équine (cellules ED, equine dermis). Certaines de ces molécules sont déjà utilisées en thérapeutique chez l'homme.

Nous souhaiterions donc évaluer leur activité antivirale *in vivo* chez un modèle préclinique, la souris, qui est un modèle d'infection par le WNV très utilisé pour mimer les conséquences cliniques de l'infection chez les hôtes mammifères. Ce travail préparatoire est indispensable avant d'envisager une étude chez le cheval pour des raisons de facilité de confinement, de coût et d'impact émotionnel.

Le nombre d'animaux sera limité autant que possible et les règles de bien-être animal ainsi que la prise en compte de la douleur respectées.

Plusieurs groupes de 5 souris (groupe infectés, groupe contrôle, groupes infectés+ traités et groupe non infecté et traité) seront constitués afin de déterminer l'innocuité et l'efficacité antivirale des molécules candidates. 50 souris seront utilisées par molécule testée. Nous estimons à 200 le nombre d'animaux à utiliser pour la totalité du projet (4 molécules à des doses différentes)

Les taux de morbidité et de mortalité seront évalués après infection et traitement des souris par différentes molécules antivirales (monothérapie ou antiviraux en synergie) nature et évolution des

manifestations cliniques, date de la mort ou survie. La charge virale dans le sang et les tissus ainsi que les cinétiques de dissémination du virus dans le cerveau seront comparées.

Comme indiqué précédemment, des études antérieures ont permis de sélectionner des molécules actives sur des cultures infectées, pour des raisons à la fois scientifiques et morales, la démonstration de leur efficacité sur des modèles animaux est nécessaire avant tout essai clinique, que ce soit sur l'animal naturellement infecté ou l'homme. La taille des groupes est fixée à 5 animaux ce qui permet d'avoir une puissance de détection d'un effet satisfaisante même si l'efficacité présente une variabilité entre les individus. Nous connaissons ce modèle et donc mettrons en place une phase de surveillance renforcée pendant l'expression clinique de la maladie chez la souris. Certains animaux seront mis à mort si les signes cliniques atteignent un certain niveau car dans ce cas, l'efficacité des molécules sera faible. Les animaux seront hébergés en groupes sociaux et des matériaux de nidification ou de jeu leur seront proposés.

15661 Le syndrome de l'intestin irritable (SII) est une maladie intestinale chronique impliquant des facteurs génétiques, environnementaux, nutritionnels. Chez les patients souffrant du syndrome sont observés des troubles de la sensibilité intestinale, des modifications de la perméabilité intestinale, une inflammation associée à des modifications de la flore bactérienne intestinale.

Un stress psychologique chronique comme le stress de séparation maternel est associé au développement d'un dysfonctionnement de la barrière intestinale et altère les mécanismes de défense de l'individu. Ce stress est reconnu comme un important facteur de risque impliqué dans l'initiation et l'aggravation de symptômes du syndrome de l'intestin irritable. Ce modèle expérimental est connu pour induire chez le rat adulte des symptômes similaires au SII. En effet, ce stress induit à l'âge adulte une augmentation de la perméabilité intestinale, une hypersensibilité douloureuse viscérale, des modifications de la muqueuse intestinale.

Des données récentes indiquent que le modèle de stress précoce est particulièrement sensible à des thérapies nutritionnelles mais cependant peu de travaux ont évalué l'incidence de ces stratégies après la naissance.

Les matrices laitières peuvent fournir un large nombre de peptides bioactifs dans le tractus gastro-intestinal. Certains peptides peuvent agir sur les cellules productrices de mucus jouant un rôle crucial dans la protection de la barrière intestinale. De manière intéressante, il a été montré que le peptide bioactif β -casofensin issu d'une matrice laitière était capable d'interagir avec les cellules intestinales en préservant l'équilibre intestinale et par conséquent prévenir des effets délétères du stress de séparation maternel.

L'objectif de ce projet de recherche est d'évaluer les effets comparatifs d'une consommation orale chronique de matrices laitières fournies par notre partenaire privée, chez le rat nouveau-né et chez l'adulte sur la perméabilité intestinale ex-vivo dans un modèle de fragilisation de la barrière intestinale et d'altération de la flore intestinale c'est-à-dire le stress de séparation maternel.

Le modèle animal reproduisant les principales caractéristiques du syndrome de l'intestin irritable est nécessaire pour une approche globale de cette pathologie et non modélisable par une approche cellulaire. Le recours à l'animal est indispensable.

Pour le présent projet, d'une durée de cinq ans, 1056 rats de laboratoire seront nécessaires comprenant des animaux nourris avec différentes matrices laitières ou le peptide bioactif β -casofensin ou le placebo. Tout est mis en œuvre pour tenir compte des règles de réduction et de raffinement. En effet, le nombre d'animaux utilisés dans chaque groupe expérimental a été limité mais nécessite d'avoir des effectifs suffisants pour atteindre une validité statistique. Les rates gestantes proviennent d'élevage agréé. Leur milieu sera enrichi en buchettes de peuplier ainsi qu'en nids de cellulose nécessaire à la nidation. Ces femelles et leurs ratons seront hébergés dans des cages normalisées et suivis quotidiennement pour leur apporter tous les soins nécessaires. Toutes les mesures seront prises pour réduire la douleur au minimum pendant les procédures expérimentales. Si la moindre souffrance ou détérioration de l'état physiologique (mauvais état du pelage, pâleur des extrémités, diminution de l'activité, perte de poids supérieure à 10% du poids initial, diarrhées) était constaté durant la surveillance de l'animal, il sera retiré de l'étude.

15662 Les anticorps monoclonaux sont issus d'un même clone de Lymphocyte B (LB) dirigés contre un épitope spécifique.

Ces dernières années, les anticorps monoclonaux sont devenus de plus en plus importants dans de nombreux domaines et particulièrement dans celui de la thérapie humaine. Ces molécules émergent de plus en plus dans le domaine de l'immuno-oncologie afin de traiter les patients atteints de nombreux types de cancer différents.

L'objectif de ce projet est donc de développer des anticorps monoclonaux obtenus par l'immunisation de souris avec des antigènes humains. Ces anticorps sont obtenus par la génération d'hybridomes. Cette technique consiste à injecter l'antigène d'intérêt chez une souris puis de prélever la rate afin d'isoler les LB sécrétant des anticorps dirigés spécifiquement contre l'antigène choisi. Ces LB sont ensuite fusionnées avec des cellules myélomateuses (cellules immortelles) afin d'obtenir des hybridomes qui ont la capacité de se multiplier plus rapidement que les cellules normales du corps productrices d'anticorps et de développer indéfiniment des anticorps spécifiques.

Ce projet utilisera au maximum 500 souris sur 5 ans (ne pouvant pas connaître à l'avance le nombre d'antigènes humains validés comme cibles et le nombre d'immunisations nécessaires à la génération d'anticorps spécifiques, ce chiffre est une estimation haute).

Afin de répondre à la règle des 3 R

- Réduire le nombre d'animaux utilisés est calculé afin d'optimiser les chances d'obtenir au minimum un anticorps d'intérêt.

Dans le cas où la/les fusion(s) réalisée(s) avec les cellules provenant de la rate des souris sélectionnées n'a (ont) pas fonctionné(s) ou que le(s) hybridome(s) ne délivre(nt) pas suffisamment d'anticorps « intéressants », un protocole retardé peut être réalisé sur une ou plusieurs souris non-choisies initialement.

Les animaux utilisés sont généralement issus de lignées consanguines.

- Remplacer afin de développer des hybridomes murins, il n'est pas possible d'utiliser de méthode alternative.

- Raffiner le choix de la souris comme animal pour les immunisations est basée sur la bonne connaissance de son système immunitaire et sa capacité à répondre efficacement à des stimulations antigéniques pour générer des LB exprimant des anticorps de bonne/forte affinité. De plus, la technique de production d'anticorps monoclonaux n'est pas réalisée sous forme d'ascites, bien que plus « performante », car celle-ci est reconnue comme très pénible pour l'animal. Les souris sont surveillées quotidiennement et une « thérapie de soutien » (solution nutritionnelle pré ou post-injection immunogène, nettoyage topique et/ou utilisation d'un analgésique approprié) peut être mise en place en cas de nécessité. Par ailleurs, les souris sont hébergées à 2-5 par cage avec un minimum de 2 enrichissements de milieu.

15663 L'objectif de cette étude est d'évaluer la distribution pulmonaire dans un modèle de souris sain de différents médicaments qui sont actuellement en cours d'évaluation clinique dans les cas sévères d'infection au SARS-CoV2, dont l'hydroxychloroquine associée ou non à l'azithromycine.

L'efficacité antivirale de ces médicaments contre le SARS-CoV2 a été évaluée *in vitro*, mais leur distribution pulmonaire n'est pas ou mal connue à ce jour, en particulier dans le cas des associations médicamenteuses. Or l'efficacité clinique de ces médicaments repose notamment sur leur distribution pulmonaire, il est donc pertinent d'apporter ces éléments de réponse et ainsi contribuer à l'optimisation des choix des stratégies thérapeutiques dans le cadre du Covid19. Par ailleurs, nous évaluerons l'interaction médicamenteuse potentielle entre l'hydroxychloroquine et l'azithromycine pouvant entraîner une augmentation de la distribution tissulaire de l'hydroxychloroquine dans les poumons et le cœur, et ainsi augmenter la toxicité cardiaque.

Pour mener à bien ce projet, nous utiliserons des souris saines adultes (âgées de 6 à 8 semaines). Nous leur administrerons les différents médicaments (7 groupes) par voie intra-péritonéale (dans la cavité de l'abdomen). Cette injection est non douloureuse et sera réalisée sans anesthésie. Les souris seront euthanasiées 30 min à 48h après l'injection (8 temps d'analyse seront réalisés afin

d'avoir un suivi longitudinal de la biodistribution). Du sang sera prélevé juste avant (sans anesthésie), les poumons et le cœur le seront en post-mortem.

Ce projet de recherche s'inscrit dans le respect de la règle des 3 R (remplacement, réduction, raffinement). En effet, seuls des médicaments testés *in vitro* et ayant démontré un potentiel thérapeutique pour le traitement du Covid19 seront utilisés dans ce projet. Cependant il est impossible de ne pas avoir recours à un modèle animal. En effet, les tests *in vitro* ne permettent pas de déterminer si ces médicaments ont bien une distribution pulmonaire, site majeur du virus dans l'organisme, cette question ne pouvant pas être abordé dans des modèles cellulaires *in vitro*. Nous nous attacherons à réduire le nombre d'animaux au maximum Le nombre d'animaux par groupe d'étude (3 souris par groupe) a été défini afin d'obtenir une puissance statistique suffisante pour conclure à partir des résultats obtenus. Au total, nous utiliserons 168 souris pour ce projet qui durera au maximum 1 an (7 médicaments testés, 8 temps d'analyse, 3 souris par groupe). Le suivi des animaux sera quotidien et effectué dans le respect du bien-être animal par l'expérimentateur, en complément de celle faite par le personnel de l'animalerie. Il sera assuré en utilisant une grille d'évaluation prenant en compte l'apparence physique et le comportement des animaux. Nous avons ainsi défini des critères d'arrêt précoce, qui lorsqu'ils sont atteints conduisent à l'euthanasie de la souris. Les souris seront euthanasiées au plus tard 2 jours après le début de la procédure ou plus tôt si un animal présente une souffrance définie par l'atteinte d'un point limite (au bout de quelques heures si les souris ne tolèrent pas bien l'administration des médicaments).

15664 Les plaquettes sanguines jouent un rôle essentiel pour arrêter les hémorragies. Certains cas de déficiences plaquettaires, qui peuvent être héréditaires ou bien acquises (par exemple lors d'accidents traumatiques ou de chimiothérapies anticancéreuses) ne peuvent actuellement être traitées que par la transfusion de concentrés plaquettaires. Ces concentrés plaquettaires sont issus du don de sang et représentent une ressource limitée. La production de plaquettes *in vitro*, en vue de pouvoir un jour suppléer au don de sang, en est encore à ses balbutiements. *In vivo*, la formation des plaquettes sanguines a lieu dans la moelle osseuse, par des mécanismes encore mal connus, ce qui freine le développement de la production de plaquettes *in vitro*. Dans le but d'élucider les mécanismes qui président à la libération de plaquettes *in vivo*, nous souhaitons utiliser une technique de visualisation de la formation des plaquettes en temps réel. Cela est possible en marquant les cellules de la moelle à l'aide d'un traceur fluorescent. Sous anesthésie générale et analgésie, nous observerons la moelle du crâne directement à travers l'os (cette zone est translucide chez la souris) afin de visualiser en temps réel la libération de plaquettes fluorescentes dans la microcirculation sanguine. Cette observation utilisera une technique de pointe, la microscopie confocale biphoton, afin de limiter les dommages causés au tissu et d'obtenir un maximum d'information tout en limitant le nombre d'animaux utilisés. Nous comparerons la manière dont les plaquettes sont formées dans des souris contrôles et dans des souris déficientes pour des protéines suspectées de jouer un rôle dans la reconnaissance des signaux mécaniques extracellulaires (nous disposons d'un total de 13 lignées).

Remplacer : les mécanismes de production *in vivo* ne sont pas encore bien connus et de ce fait non encore maîtrisés *in vitro*, ce qui limite la production de plaquettes *in vitro*. Actuellement un gros effort est mené dans quelques laboratoires dans le monde pour modéliser la moelle osseuse en bioréacteur *in vitro*, mais il nous manque des connaissances mécanistiques pour obtenir une croissance optimale des cellules *in vitro*, à l'exemple de ce que l'on trouve *in vivo*. Etudier ces mécanismes directement dans l'organisme reste indispensable pour élargir nos connaissances afin de pouvoir améliorer les bioréacteurs en vue d'une production optimale de plaquettes *in vitro*.

Raffiner : Les conditions du travail seront raffinées afin de limiter l'anxiété, l'inconfort, le stress et la douleur associés aux manipulations des souris avant l'anesthésie. Durant l'expérimentation, les souris sont maintenues sous anesthésie générale et analgésie et seront euthanasiées avant leur réveil afin d'éviter toute souffrance. Dans tous les cas, les cages sont enrichies en jouets et coton à déchiqueter pour qu'elles y fassent leur nid, et sont manipulées avec calme et par des manipulateurs avertis pour limiter le stress de contention dans l'intérêt du bien-être animal.

Réduire Les événements de libération de plaquette sont relativement rares et actuellement imprévisibles. Sur la base de nos données préliminaires, nous anticipons 3 souris observées pour pouvoir visualiser 1 événement d'intérêt 1) la cellule mère libérant les plaquettes, 2) l'élongation de la proplaquette. Pour chaque événement nous souhaitons obtenir 15 valeurs par génotype, soit 90 souris sont anticipées par génotype. Il s'agit d'un nombre maximal qui sera vraisemblablement revu à la baisse au fur et à mesure que notre expérience nous permettra de repérer les cellules « prêtes » à libérer les plaquettes. Nous prévoyons donc 90 souris par génotype, soit un total maximal de 1170 animaux pour nos 13 lignées. Pour comparer et analyser les différents paramètres entre 3 ou plusieurs groupes de souris, nous utiliserons les tests statistiques OneWay ANOVA.

15665 L'addiction est un vrai problème de santé publique. La cocaïne est le premier psychostimulant consommé dans le monde et représente un problème majeur de santé avec des conséquences sociales et économiques. La variabilité interindividuelle de la réponse aux psychostimulants détermine de façon significative l'évolution vers l'état d'abus et de dépendance. 30% des consommateurs de cocaïne deviennent dépendants au cours des deux premières années de consommation. Les raisons pour lesquelles un individu devient dépendant à une drogue d'abus et pas un autre restent encore incompréhensibles. L'addiction est caractérisée par une tendance chronique à la rechute. L'arrêt de la prise de drogue chez les individus devenus dépendants aux psychostimulants est difficile. Dans 90% des cas, les cocaïnomanes rechutent même après une longue période d'abstinence. D'autre part, depuis une dizaine d'années une nouvelle catégorie de substances psychostimulantes, les nouvelles substances psychoactives, sont apparues sur le marché international des drogues récréatives comme des alternatives légales aux psychostimulants.

Pour bien comprendre les mécanismes induits par les drogues d'abus sur le système nerveux central pouvant conduire à la dépendance, l'utilisation de modèles animaux offre un potentiel important. Ces modèles animaux ont principalement été développés chez le rongeur en raison des fortes homologues physiologiques et comportementales inter-espèces, permettant une extrapolation de certaines données du rongeur à l'homme.

Deux défis majeurs dans la compréhension des troubles liés à la consommation excessive de psychostimulants sont de mieux comprendre les mécanismes moléculaires mis en jeu lors de la prise de drogue et à l'origine de la rechute suite à une période de sevrage.

L'objectif principal de notre projet, multidisciplinaire et longitudinal, est d'identifier les mécanismes mis en jeu lors de la prise de trois psychostimulants. Pour cela nous souhaitons explorer des hypothèses comportementales et mécanistiques par des approches fonctionnelles et moléculaires au niveau du système nerveux central chez des rats.

Les adaptations neurocomportementales et moléculaires induites par la prise de psychostimulants sont trop complexes pour être modélisées *in vitro*, ce projet nécessite l'utilisation d'animaux. Néanmoins nous satisferons aux exigences (1) de réduction, en limitant strictement le nombre d'animaux à celui nécessaire à la validité statistique des résultats obtenus et (2) de raffinement, en limitant au maximum le stress et la douleur des animaux au cours des expériences (les procédures sont réalisées sous anesthésie générale et antalgiques, définition de points limites au-delà desquels les animaux doivent être euthanasiés). En revanche, le remplacement des rongeurs par des invertébrés, très éloignés de l'Homme en terme de neuroadaptation, ou par des approches *in silico*, incapables de modéliser des processus aussi complexes, ne permettrait pas de répondre aux questions posées. Notre projet est prévu pour durer 5 ans. Il nécessite 1680 rats - répartis en 3 différents lots (un lot par drogue). Les animaux recevront des administrations intrapéritonéales de la drogue étudiée pour suivre leur comportement cognitif et émotionnel (activité locomotrice, stress, anxiété, mémoire) après ou non arrêt du traitement durant 15 jours. Les cerveaux seront prélevés après euthanasies pour des études moléculaires pour analyser l'impact du traitement sur l'expression des gènes du cerveau.

En conclusion, nos résultats nous permettent de mieux comprendre les voies mises en jeu dans la mise en place de l'addiction et de mieux caractériser les risques de rechute dans un objectif clinique d'améliorer la prise en charge de la toxicomanie.

15666 La technologie des anticorps monoclonaux est un outil permettant la production d'anticorps hautement spécifiques et a des répercussions considérables sur les méthodes de diagnostic et de thérapie ainsi que sur l'ensemble de la recherche biomédicale. Cette technologie comprend l'immunisation des souris avec des antigènes connus et la préparation de cellules hybrides (hybridomes) par fusion de lymphocytes prélevés sur les souris immunisées et des cellules myélomateuse. Elle aboutit à l'établissement de cellules monoclonales sécrétant un seul type d'anticorps. Ces cellules peuvent être cultivées *in vitro* pour produire de l'anticorps ou injectées dans le péritoine de souris pour obtenir un liquide d'ascites riche en anticorps.

REMPACER : La majorité des anticorps est obtenue chez l'animal. La génération des anticorps par immunisation *in vitro* est très difficile à cause de la faible durée de vie des lymphocytes en culture. Les anticorps monoclonaux sont essentiellement produits chez la souris car les cellules myélomateuses ayant des caractéristiques permettant de générer des hybridomes n'existent que pour cette espèce.

L'intérêt du liquide d'ascites chez la souris réside dans le fait que tous les hybridomes ne prolifèrent pas bien *in vitro* et l'anticorps produit *in vitro* est de très faible concentration et pourrait être de plus faible affinité. Nous avons réalisé de nombreux tests de production d'anticorps à partir des cultures d'hybridomes *in vitro* et mis au point une méthode qui, même s'elle n'atteint pas le niveau du liquide d'ascites, permet de produire une quantité raisonnable d'anticorps. Cette méthode sera utilisée autant que possible pour réduire la production du liquide d'ascites.

REDUIRE : Pour chaque programme, nous limitons l'utilisation de souris à deux pour l'immunisation et au maximum cinq pour la production du liquide d'ascites. Nous réalisons entre 20 et 40 programmes par an. soit un maximum de 1400 souris sur une période de 5 ans.

RAFFINER : Les prélèvements de sang sont réalisés dans la région maxillo-faciale contrairement aux prélèvements au niveau du sinus retro-orbital plus contraignant pour l'animal. Une désinfection locale de la peau est réalisée avant chaque injection.

Pour la production du liquide d'ascites un amorçage de souris est réalisé en utilisant l'adjuvant incomplet de Freund, moins invasif que le pristane habituellement utilisé.

Les animaux sont suivis quotidiennement tout au long de l'expérimentation et afin d'éviter toute souffrance, ils reçoivent un traitement antidouleur par injection en sous-cutané de buprénorphine (0.05 à 0.1 mg/kg). Cette molécule est un antalgique morphinique, donc sans activité anti-inflammatoire.

Les animaux présentant des signes de douleur dépassant le seuil fixés sont sortis du protocole expérimental.

15667 I. Contexte scientifique

Notre information génétique est constituée de molécules d'ADN, logées dans un compartiment appelé noyau, au sein de chacune de nos cellules. Cet ADN est d'une longueur très impressionnante, environ 2 mètres, pourtant, nos cellules ont des tailles environ un à dix millions de fois plus petites! En fait l'ADN est compacté et organisé dans le noyau par des protéines spécialisées et cette organisation est essentielle afin d'utiliser correctement l'information qui y est logée. Dans ce contexte, nous sommes particulièrement intéressés par l'étude des rôles spécifiques des facteurs qui contribuent à ces processus. De manière frappante, plusieurs études récentes, rendues possibles grâce aux nouvelles technologies de séquençage, ont identifié des erreurs (mutations) fréquentes de ces facteurs dans des cancers tissu-spécifiques. Parmi eux, on peut citer les cancers du cerveau chez l'enfant, appelés glioblastomes, qui sont très agressifs et sans traitement efficace pour le moment. Comme attendu, les mutations de ces facteurs sont associées à une désorganisation de la compaction de l'ADN et une utilisation incorrecte de l'information génétique dans les cellules cancéreuses.

II. Objectifs du projet

Le projet vise à analyser les rôles spécifiques de protéines impliqués dans l'organisation et la « lecture » des molécules d'ADN. A cette fin, différents types de cellules seront analysés chez la souris, au cours du développement et chez l'animal adulte et dans un contexte sensibilisé au développement tumoral.

III. Avantages du projet

La souris a été choisie comme modèle *in vivo* pour son génome bien caractérisé et la possibilité de générer de nouvelles lignées génétiquement modifiées. Seul le modèle animal permet de procurer un système physiologique donnant l'accès à des cellules différentes (en division ou pas) et âges différentes (embryonnaire, périnatale ou adulte). La souris constitue un outil de recherche fondamental unique pour comprendre les mécanismes mis en jeu lors du développement normal et pathologique. De plus, la disponibilité d'un grand nombre d'outils génétiques (lignées murines) permet une analyse fine des réseaux biologiques mis en jeu.

IV. Dommages escomptés

Différents phénotypes (stérilité, létalité précoce, développement de tumeurs), actuellement inconnus, sont envisageables et pourraient être relevés lors de la surveillance quotidienne et les analyses des animaux.

V. Respect des 3R

Remplacer il existe plusieurs études, visant à comprendre la fonction des protéines que nous proposons d'étudier, mais elles ont été réalisées *in vitro* ou dans des lignées cellulaires. Ces approches aident à notre compréhension de l'importance d'organiser et orchestrer l'utilisation de l'information génétique dans nos cellules. Cependant, la limite des approches utilisant des lignées cellulaires est qu'elles ne permettent pas de prendre en compte le contexte tissu-spécifique et sont basées parfois sur des cellules ayant un génome modifié qui n'est pas représentatif des contextes développementaux ou tumoraux spécifiques. Une partie de l'étude sera basée sur la dérivation et l'analyse de cellules primaires en culture, porteuses de modifications génétiques bien contrôlées, afin de remplacer et réduire le nombre d'animaux utilisés.

Réduire Nous proposons d'utiliser un maximum de 1302 souris sur une durée de 5 ans. Ce nombre est défini d'après les travaux de consortiums internationaux (IMPreSS). Ainsi le nombre d'animaux est réduit tout en permettant des conditions d'analyse rigoureuse et fiable. L'utilisation d'approches alternatives telles que la dérivation de cultures de cellules primaires et d'organoïdes est également envisagée afin de remplacer et réduire le nombre d'animaux utilisés.

Raffiner En accord avec les recommandations internationales dans le domaine de la cancérologie, les animaux seront suivis quotidiennement. Leur état sera évalué selon une grille de scores qui orientera la prise en charge, ceci afin d'assurer une expérimentation dans le respect du bien-être animal.

15668 Le déconditionnement musculaire, qui désigne une perte de masse et de force musculaire, peut être observée dans différentes situations physiologiques et surtout pathologiques (cancer, myopathie, insuffisances cardiaque, rénale ou respiratoire). Dans le cas du cancer, ce déconditionnement musculaire est extrêmement marqué (on parle de cachexie associée au cancer) et constitue un facteur majeur contribuant à la réduction de la qualité de vie des patients et à l'évolution péjorative de l'état de santé des patients. Disposer d'un modèle murin reproduisant la cachexie associée au cancer est essentiel pour le développement de stratégies permettant de limiter ou prévenir ce syndrome catabolique.

La souris *ApcMin/+* (*Apc* Adenomatous polyposis coli – *Min* Multiple intestinal neoplasia) est issue d'une lignée obtenue après traitement par un agent mutagène, le N-nitroso-N-éthylurée. Il ne s'agit donc pas d'un organisme génétiquement modifié. Des études ultérieures ont permis de montrer qu'une mutation non-sens dans le gène *Apc* était à l'origine de ce phénotype. Chez l'humain, des mutations du gène *Apc* sont responsables de la polypose adénomateuse familiale, affection héréditaire caractérisée par le développement de centaines ou de milliers de polypes dans le côlon

et le rectum. A l'état hétérozygote, la mutation du gène Apc entraîne le développement spontané de multiples adénomes au niveau de l'intestin, adénomes qui se transforment en adénocarcinomes. La progression dans la maladie est également associée au développement d'un syndrome cachectique qui s'exprime vers la dixième semaine de vie. La demi-vie de la souris ApcMin/+ est de l'ordre de 20-25 semaines.

Notre objectif ici est de maintenir pour les 5 prochaines années la lignée ApcMin/+ afin de pouvoir l'utiliser dans le cadre de nos protocoles expérimentaux de recherche sur les mécanismes de la cachexie associée au cancer. Pour cela, des souris mâles hétérozygotes mutés pour le gène Apc sous fond génétique C57Bl6/J seront croisées avec des souris femelles C57Bl6/J. Les souris mâles issus du croisement seront génotypés. Les souris mâles Apc/Min+ conservées à des fins de reproduction. Dix mâles par an seront ainsi produits pour entretenir la lignée (soit 50 souris mâles pour la période de 5 ans). On estime à 1/8 le nombre de souris mâles Apc/Min+ qui pourront être issues de ce croisement.

Les conditions d'hébergement seront les suivantes :

- chaque animal bénéficiera d'une attention et de soins de qualité, par du personnel qualifié afin d'assurer un bien-être optimal.
- les animaux seront hébergés en groupes harmonieux (de 2 à 4 selon les groupes) dans un environnement enrichi (copeaux, matériel de nidification, bâtonnets à ronger).
- l'eau et la nourriture seront mises à disposition "ad libitum" et de la musique sera diffusée en salle d'hébergement pour diminuer le stress et atténuer les bruits environnementaux.

15669 Le vieillissement normal du cerveau s'accompagne d'un déclin de la neurogénèse adulte, de la plasticité neuronale et des fonctions cognitives. Ces modifications commencent à se développer autour de 65 ans et l'une des régions cérébrales les plus affectées est l'hippocampe, ce qui conduit à des déficits d'apprentissage et à un déclin de la mémoire.

Avec l'accroissement de l'espérance de vie, le nombre de personnes touchées par une perte des fonctions mnésiques liée à l'âge est inexorablement appelé à augmenter dans les prochaines décennies. Par conséquent, une meilleure compréhension de la façon dont notre cerveau vieillit et l'identification des mécanismes cellulaires permettant le maintien de nos fonctions mentales, pourraient conduire au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour prévenir le déclin et/ou restaurer la résilience de notre santé mentale durant le vieillissement.

De nouvelles données indiquent que l'administration de plasma jeune améliore la mémoire chez les souris âgées, ce qui met en évidence le rôle des facteurs systémiques dans le maintien de la forme cognitive. En conséquence, nous avons identifié l'ostéocalcine (Ocn), une hormone d'origine osseuse, comme facteur nécessaire de plasma jeune qui améliore la mémoire chez les souris âgées. Les effets bénéfiques de l'exposition à un « jeune » système systémique sur le déclin de la mémoire lié à l'âge soulèvent une question cruciale : quels sont les effecteurs intracellulaires de ces facteurs de rajeunissement dans les neurones hippocampiques ? Des travaux récents montrent que l'autophagie (nettoyage cellulaire) dans les neurones hippocampiques favorise la formation de mémoire en modulant la plasticité synaptique.

Nous émettons l'hypothèse que l'autophagie du cerveau joue un rôle vital, encore inexploré, dans la convergence des facteurs systémiques sur les neurones hippocampiques pour favoriser la cognition.

L'expérimentation *in vitro* ne permet pas de répondre à toutes les questions, bien que nous l'utilisions. Seule l'expérimentation animale permet d'étudier ce phénomène en conditions physiologiques et physiopathologiques et d'observer les effets de l'inactivation de notre gène d'intérêt dans son ensemble.

Nous utiliserons des souris de 8 semaines, 3 mois et 16 mois pour vérifier notre hypothèse, le nombre de souris nécessaires sera de 4736 sur 5 ans.

Différents produits activateurs ou inhibiteurs des gènes de l'autophagie seront injectés dans l'hippocampe des souris avant de les soumettre à différents tests comportementaux.

Pour respecter le principe des 3R, le nombre de souris utilisées sera réduit à son minimum analyses de paramètre multiples pour chaque souris et utilisation de tests statistiques adaptés. La chirurgie (injection intra-hippocampique) aura lieu sous anesthésie générale pour éviter toute douleur et des antalgiques sont prévus en post-opératoire. Pour assurer le bien-être des souris, elles bénéficieront de coton et de « maisons » en carton afin de les occuper et afin qu'elles puissent se construire un « nid ». Les souris seront sous surveillance journalière et des points limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

En résumé, ce projet pourrait permettre d'identifier un nouveau rôle physiologique de l'autophagie dans le cerveau et conduire au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour restaurer/prévenir les effets délétères du vieillissement sur le cerveau.

15670 Avec plus de 50 000 cas par an en France, la chirurgie colorectale est une chirurgie réalisée quotidiennement dans la plupart des centres hospitaliers publics ou privés. Elle reste grevée en postopératoire d'une morbidité importante et sa mortalité n'est pas nulle. La complication spécifique la plus grave et pourvoyeuse de cette morbi-mortalité est la mauvaise cicatrisation des anastomoses (fistule anastomotique).

Afin de diminuer la gravité de cette complication, on met en place régulièrement une stomie ("anus artificiel") provisoire de protection qui a des conséquences psychologiques pour le patient, qui peut avoir des complications et surtout nécessite une nouvelle intervention chirurgicale pour la remise en continuité du circuit digestif.

Un dispositif de dérivation interne a été breveté et démontré son efficacité (études pré-clinique) dans le but de remplacer les stomies de protection. Le dispositif est un stent entéral couvert, relié à son extrémité distale à une longue gaine souple, pour réaliser un by-pass intra colique provisoire.

Le but de ce travail est d'évaluer la tolérance de ce dispositif sur le tube digestif, avant son utilisation chez l'humain.

Le modèle porcin a été choisi en raison de sa grande taille et de sa proximité anatomique et histologique avec l'homme.

La règle des 3 R est largement prise en compte puisque

- Le modèle animal a été réservé à la validation définitive de la tolérance, de nombreux tests ayant été réalisés sur banc d'essai. Seul le modèle animal vivant permet les études histologiques (exigence ANSM et FDA).

- Il s'agit de procédures chirurgicales standard pour lesquelles une anesthésie et une analgésie (per et postopératoire) adaptées sont utilisées. La souffrance animale est donc réduite au maximum. Les animaux sont stabulés au maximum 3 jours en amont de ces procédures, dans un milieu enrichi comme exigé par la réglementation animale (balle, cordes, jouets spécifiques non dangereux notamment du risque d'inhalation et/ou d'ingestion).

- Les animaux seront opérés par groupes de six sans groupe témoin pour minimiser leur nombre

- Le nombre total d'animaux est de 24 qui devraient permettre de vérifier l'absence de lésions délétères du dispositif.

15671 L'inflammation est un ensemble de réactions générées par l'organisme en réponse à un stimulus externe ou interne. Il arrive dans certains cas que l'inflammation persiste jusqu'à devenir chronique, elle peut alors être responsable de séquelles anatomiques et fonctionnelles. Actuellement le diagnostic des inflammations repose sur 3 points (1) les signes cliniques (rougeur, douleur, augmentation de la température, ...), (2) l'analyse biologiques (augmentation dans le sang de protéine inflammatoire, ...) et (3) l'imagerie isotopique (scintigraphie) qui permet de localiser le(s) foyer(s) inflammatoire(s) dans le corp entier.

L'imagerie par scintigraphie des globules blancs (GB) radiomarqués est une technique complexe qui nécessite plusieurs étapes le prélèvement des GB du patient, leurs radio-marquages, puis leurs réinjections au patient et enfin le passage sous caméra SPECT permettant de visualiser les lieux de fixations des GB radiomarqué (foyers inflammatoires) dans le corps entier. La qualité de cet

examen va dépendre de la quantité de GB qu'il aura été possible de prélever et du rendement de radiomarquage, représentant 2 paramètres extrêmement limitants.

L'objectif de ce projet consiste à développer une imagerie plus spécifique et reproductible à base de nanoparticules radiomarquées, dans l'espoir de mieux localiser le foyer inflammatoire.

REMPACEMENT Pour mener à bien ce projet nous avons besoin d'un modèle permettant de tenir compte de toutes les modifications biologiques qu'implique l'inflammation. Les modèles d'inflammation chez la souris par injection sous cutanée ou intracérébrale de lipopolysaccharides (molécule présente sur les membranes des bactéries qui est responsable de la réponse inflammatoire lors de l'infection) sont des modèles simples et exhaustivement décrits dans la littérature. C'est sur ces modèles que nous allons basés notre étude.

RAFFINEMENT Afin d'avoir une évaluation complète de ce nouveau traceur pour l'imagerie de l'inflammation, nous ferons une comparaison de la biodistribution de notre traceur au cours du temps sous 2 formes avec 3 autres traceurs déjà utilisés en imagerie clinique, et nous compléterons par une étude immunohistologique des tissus. Les études préalables sur ces modèles ont montré que le pic d'inflammation apparait au cours de la première semaine, notre étude sur les animaux se limitera à cette période de 7 jours. Au cours de l'étude, les souris seront hébergées par 5 dans des cages enrichies de dômes et copeaux, sur portoir ventilé, dans une pièce avec des cycles de lumière-obscurité de 12h, dont la température et l'hygrométrie sont contrôlées en permanence et avec un accès libre illimité à de la nourriture et à de l'eau. Le bien-être des animaux sera surveillé quotidiennement par du personnel qualifié ce qui nous permettra d'intervenir immédiatement dès le moindre signe de souffrance pour la prendre en charge. Pour limiter au maximum la souffrance et le stress des animaux, les chirurgies seront faites sous anesthésie et analgésie avec une surveillance accrue des animaux jusqu'à leur réveil et toutes les imageries seront faites sous anesthésie gazeuse.

REDUCTION Sur l'ensemble de ce projet, nous utiliserons 264 souris. Ce nombre d'animaux a été déterminé afin de réduire au maximum le nombre d'animaux nécessaires sans compromettre la validité des expériences qui seront menées. Il tient compte du suivi de deux modèles d'inflammation avec 5 radiotraceurs différents et d'une étude immuno-histochimique de la cinétique de l'inflammation. L'imagerie moléculaire isotopique microTEP/CT et microSPECT/CT nous permet de faire une comparaison quantitative des signaux isotopiques de chacun des radiotraceurs, étudiés de manière longitudinale sur les mêmes animaux, contribuant à réduire le nombre d'animaux nécessaires.

15672 Les fibroblastes associés au cancer (CAF pour cancer-associated fibroblasts) semblent être des cellules incontournables de l'environnement tumoral en contribuant à la prolifération des cellules cancéreuses, en rendant les tumeurs imperméables au système immunitaire et en favorisant le développement de métastases. Les tumeurs contenant de nombreux CAF sont souvent cliniquement agressives, résistantes à la thérapie conventionnelle et associées à une mauvaise survie.

Les CAF favorisent l'évasion immunitaire de la tumeur, la protégeant de l'attaque tumorale par le système immunitaire des patients. Des données de la littérature suggèrent que les patients atteints de tumeurs riches en CAF ne répondent pas autant aux traitements, notamment aux immunothérapies. Le ciblage des CAF, associé à des thérapies conventionnelles ou à une immunothérapie, pourrait conduire à un bénéfice thérapeutique surtout aux patients atteints de tumeurs riches en CAF.

Nous supposons que le ciblage des CAF rendra la tumeur plus immunologiquement « visible »; La complexité du système immunitaire ne peut être modélisée *in vitro* et nécessite l'utilisation de modèles *in vivo*, qui prennent mieux en compte les interactions stroma/cellules immunitaires.

D'après des recherches antérieures, NOX4 joue un rôle important dans la différenciation et l'activation des fibroblastes présents dans le microenvironnement tumoral favorisant la production des espèces réactives d'oxygène (ROS) ce qui a pour conséquence d'influencer l'organisation et la prolifération du tissu constituant la matrice extracellulaire entourant les tumeurs. Cela en fait une

cible thérapeutique de choix pour réduire la différenciation des fibroblastes favorisant la maladie dans le microenvironnement du cancer.

Lors d'un précédent projet collaboratif, cibler les CAF en utilisant le setanaxib comme inhibiteur de la NADPH oxydase 4, a donné de très bons résultats prometteurs, dans un modèle syngénique de tumeur colorectale de souris, aux tumeurs hautement fibrotiques (riches en CAF) et résistantes aux immunothérapies. Le traitement avec le setanaxib a permis au système immunitaire d'infiltrer et de combattre les tumeurs mais de manière plus impressionnante d'amplifier la réponse d'un traitement par immunothérapie avec un anticorps anti PD1. Nous voudrions alors étudier un plus grand panel de molécules inhibitrices de NOX4 dans ce modèle, afin d'affiner le potentiel thérapeutique de cette inhibition et aboutir à la sélection d'un candidat clinique.

Pour limiter l'invasivité et le stress du gavage oral, les souris seront traitées une fois par jour. Dans la mesure du possible, la molécule sera administrée dans un volume de 100µL pour restreindre l'inconfort du gavage.

Les animaux seront soigneusement surveillés et le développement et la croissance des tumeurs seront mesurés tout au long de l'étude. Le seuil maximal de volume de tumeur acceptable sera fixé à 2000mm³. Au-delà de ce seuil de volume les animaux seront euthanasiés pour ne pas induire de souffrances inutiles. Les animaux seront observés et pesés pour s'assurer qu'ils montrent des signes de comportement et d'alimentation normaux. Les souris seront hébergées par 6 pour permettre l'interaction sociale, avec un environnement enrichi par des cotons de ouate et des petits dômes rouges pour confectionner des nids.

D'après les études antérieures, le nombre d'animaux requis pour obtenir des données significatives est évalué à 12 par groupe, soit 312 pour la durée du projet, incluant la phase pilote. Pour une comparaison directe des données entre deux groupes, le t-test bilatéral non apparié est utilisé. La correction de Welch sera appliquée à la valeur de P pour normaliser les données où la variance diffère significativement entre deux groupes.

15673 La maladie de Stargardt est une dégénérescence rétinienne avec une prévalence de 1 pour 8000/10000 personnes. Dans cette rétinopathie la perte de cônes, cellules de la macula nécessaires à la vision diurne, entraîne la cécité. Il n'existe pas de traitement pour cette cécité impactant hommes et femmes entre 15 et 40 ans. La physiopathologie de la maladie se traduit par l'augmentation de déchets de vitamine A, les rétinoïdes, augmentation attribuée aux mutations affectant le gène *Abca4*. Ce gène est trop grand pour être intégré dans un vecteur adéno-associé recombinant (rAAV) aussi une approche alternative est nécessaire.

La stratégie consiste à délivrer deux rAAVs, chacun étant porteur d'une moitié du gène *Abca4*. Les deux moitiés de la protéine avec des structures spécifiques appelées 'intéines' sur chaque extrémité sont produites. C'est grâce aux intéines qu'une ligation se fait dans la cellule pour reconstruire la protéine entière. *In vitro*, il a été démontré l'efficacité de cette stratégie avec un potentiel effet thérapeutique.

Ce projet est une étude de preuve de concept pour comparer l'efficacité des intéines dans le modèle de la maladie de Stargardt avec pour objectif de réduire le taux de bisrétinoïdes chez les souris *Abca4* KO (Knock-Out modification génétique pour inactivation d'un gène) par expression de la protéine complète d'ABCA4 en maintenant la structure de la rétine.

Ce projet comporte 2 phases

Phase 1 comparaison de constructions d'AAV avec intéine afin de comparer 2 concentrations d'AAV et 2 promoteurs différents.

6 groupes de souris WT (Wild Type) seront inclus dans cette phase, avec 6 (groupes 1 et 4) ou 10 animaux /groupe, Cf. annexe 2.

Ces 52 souris WT recevront les vecteurs par voie sous rétinienne dans un seul oeil, l'oeil controlatéral étant injecté avec une solution saline.

Deux examens ophtalmiques seront réalisés à 4-6 semaines post-injection un Fond d'Oeil (FO) afin de monitorer l'expression de l'EGFP (forme améliorée de la protéine fluorescente verte, Enhanced

Green Fluorescent Protein) et une Tomographie à Cohérence Optique (OCT) pour évaluer la structure des rétines.

Phase 2 Étude d'efficacité de la thérapie par injection d'AAV avec intéines chez la souris Abca4 KO pour la maladie de Stargardt. Des vecteurs AAV à base d'Abca4-intéine seront injectés avec différentes constructions sous le promoteur GRK1 (G-protein-coupled receptor kinases), afin de comparer 2 intéines, Cfa et Npu.

Trois groupes de souris Abca4 KO, et 1 groupe de souris WT, seront inclus dans cette phase, avec 8 animaux /groupe, Cf. annexe 2.

16 souris Abca4 KO seront injectées par voie sous-rétinienne dans les 2 yeux avec des vecteurs AAV tandis que 8 autres souris Abca4 KO et 8 souris WT recevront une solution saline. Les animaux seront suivis pendant 3 mois.

Un FO afin de monitorer le niveau de bisrétinoïdes et un OCT seront réalisés à 1 semaine pré-injection et 3 mois post-injection.

Après sacrifice de tous les animaux, les globes oculaires seront prélevés pour différentes analyses.

Ce projet nécessite 24 souris Abca4 KO et 60 souris WT. Nous incluons un maximum de 80 souris WT et 32 souris Abca4 KO avec un maximum de 10 animaux/groupe selon le groupe expérimental. S'agissant d'une étude de preuve de concept, selon les premiers résultats, des groupes supplémentaires pourraient être nécessaires comme dupliquer un groupe de souris WT et/ou KO pour confirmation des résultats ou modifier des paramètres tels que les concentrations des vecteurs injectés pour compléments d'information. Il faut également tenir compte des animaux qui pourraient être exclus de l'étude (raison éthique ou injection non exploitable) et donc remplacés (maximum 2 souris /groupe) afin d'obtenir le nombre suffisant de souris pour les tests statistiques.

Application des 3R

1) Réduction : Utiliser l'oeil controlatéral comme contrôle permet de réduire le nombre d'animaux pour la phase 1 et annule toute variabilité inter-individus. Par contre pour une des analyses post-mortem de la phase 2 (spectrométrie de masse) nous ne pouvons pas garantir que le cycle visuel soit complètement indépendant entre les deux yeux, aussi l'œil controlatéral ne peut pas servir de contrôle. Pour choisir le nombre minimal de souris/groupe nous avons fait une analyse de puissance (puissance de 80% et significativité de 5%). Les données précédentes générées donnent l'écart-type attendu et la différence nécessaire pour avoir une mesure significative. Cela semble être un nombre minimal permettant d'assurer la robustesse des résultats sans qu'il soit excessif en termes d'animaux. Un t-test non-apparié bilatéral pour comparer les résultats des groupes sera réalisé.

2) Raffinement : - des conditions d'hébergement selon la réglementation en vigueur avec enrichissement du milieu dômes en cellulose, frisottis de papier (sizzle dry), bûchettes de bois et hébergement à 3 animaux dès que possible

- contrôle des conditions de luminosité dans les cages (entre 10 et 30 lux), en nous assurant qu'elles soient toujours au même niveau sur les portoirs et en gardant la salle en basse lumière.

- un suivi régulier des animaux observations biquotidiennes, pesées régulières, analyse du comportement

- Les injections sous-rétiennes seront réalisées sous anesthésie gazeuse puis relais par anesthésie fixe par injection intramusculaire d'un mélange de xylazine (10 mg/kg)/kétamine (100 mg/kg).

- Une anesthésie locale des 2 yeux par instillation d'une goutte d'Oxybuprocaine®

- Les OCT et FO anesthésie gazeuse (mélange Isoflurane 5% / oxygène, 1L/min) ou anesthésie fixe par injection intramusculaire d'un mélange de xylazine (10 mg/kg) / kétamine (100 mg/kg).

L'humidification de la cornée est réalisée avec un gel ophtalmique.

Un traitement post-opératoire est mis en place afin d'éviter l'inflammation et le dessèchement de la cornée.

- une réactivité accrue du personnel animalier avec l'aide d'une grille de scoring de la douleur (Cf. annexe I) afin de détecter précocement tout point limite et mettre en place les actions adéquates.

3) Remplacement : La rétine, structure complexe composée de multiples couches de neurones et cellules nourricières, ne peut être reconstituée parfaitement *in vitro*. Il existe aujourd'hui des protocoles modélisant la rétine à partir de cellules souches différenciées, mais l'interaction complexe du cycle visuel ne peut pas être testée *in vitro*. Le modèle animal est donc indispensable pour étudier la pathophysiologie et le transfert de gènes dans la rétine.

15674 Plus de 5% de la population française est diabétique, et parmi ces patients, 90% sont atteints d'un diabète de type 2, qui se caractérise par le développement d'une résistance à l'insuline. Le diabète entraîne des complications graves à long terme, comme des complications cardiovasculaires, microvasculaires, neuropathiques ou des maladies hépatiques. Le principal facteur de risque de développer un diabète de type 2 est l'apparition d'une obésité due à une alimentation trop riche associée à une dépense physique diminuée.

Un des enjeux de la recherche sur le diabète de type 2 est de découvrir les mécanismes impliqués dans l'apparition de la maladie, et dans le développement de la résistance à l'insuline et du diabète en réponse à l'obésité.

L'obésité se caractérise par une expansion du tissu adipeux et un dysfonctionnement des capacités métaboliques de ce tissu. En particulier, le tissu adipeux subit un remodelage métabolique induisant l'apparition d'une hypoxie tissulaire (manque d'oxygénation) et d'une inflammation accompagnée de l'augmentation de la production de molécules pro-inflammatoires. Cet environnement pro-inflammatoire altère la voie de signalisation de l'insuline aussi bien au niveau du tissu adipeux qu'au niveau systémique en induisant une résistance à l'insuline dans les tissus périphériques, comme les muscles.

Le but de ce projet est d'étudier le rôle d'une protéine cible de l'hypoxie, dont l'expression est augmentée lors de l'obésité dans le développement de la résistance à l'insuline. Notre équipe a déjà démontré que l'expression de cette protéine est augmentée lors de l'obésité dans le foie et le tissu adipeux et qu'elle est impliquée dans le développement des processus inflammatoires. En utilisant des souris invalidées pour le gène codant pour cette protéine, nous avons démontré que son absence protège les souris du développement d'une stéatose hépatique induite par un régime riche en graisses.

Le but de ce projet est d'étudier l'effet d'une diminution partielle de l'expression de cette protéine (souris hétérozygote +/-) sur le développement de la résistance à l'insuline sous régime normal et sous régime riche en graisses. Ce projet fait suite à un projet au cours duquel nous avons observé que les souris hétérozygotes +/- développent une résistance à l'insuline et une intolérance au glucose plus importante que les souris sauvages.

Nous caractériserons le phénotype de ces souris dans des conditions standards ou sous régime riche en graisse (prise alimentaire, poids, métabolisme de base par calorimétrie indirecte, observation du développement de la résistance à l'insuline). Pour chaque expérience un groupe contrôle de souris sauvage sur fond C57Bl6/J sera utilisé. Ce projet nécessitera une utilisation maximum de 1442 souris.

Pour satisfaire au remplacement, nous avons réalisé des études sur des cellules adipocytaires cultivées *in vitro* et nous avons montré que la diminution de cette protéine diminue la voie de signalisation de l'insuline et induit une résistance à l'insuline *in vitro*.

Pour comprendre l'implication de cette protéine chez l'Homme, il nous est maintenant nécessaire de l'étudier sur l'animal car il n'existe pas de méthodes alternatives permettant de tenir compte de toute la complexité et de toutes les interactions existantes entre cellules et organes dans un organisme. Pour satisfaire à la réduction, les animaux contrôles (+/+) pourront être communs à différentes procédures et une gestion éthique de l'élevage nous permettra de ne pas générer trop d'animaux en excès. D'autre part, chaque procédure utilise un nombre d'animaux minimum mais nécessaire à des études statistiques pertinentes. Pour satisfaire au raffinement, l'hébergement sera réalisé dans des locaux appropriés, avec un enrichissement systématique, les personnes réalisant les différentes procédures respecteront les règles d'éthiques. Enfin, bien qu'aucune souffrance particulière des animaux ne soit attendue, nos surveillances régulières nous permettront d'identifier

les souris souffrantes et de prendre les mesures nécessaires (surveillance accrue ou euthanasie dans les cas les plus graves).

En conclusion, ce projet identifiera des mécanismes moléculaires impliqués dans le développement de la résistance à l'insuline associée à l'obésité.

15675 Depuis de nombreuses années il est admis que la formation des métastases, qui est la principale cause de mort attribuée au cancer, est un processus tardif dans l'évolution de la maladie. Pourtant récemment des publications utilisant des modèles murins notamment dans le cancer du sein et du pancréas suggèrent qu'il existe également une dissémination précoce avant même l'apparition des premières tumeurs. Nous voulons savoir ce qu'il en est pour le cancer du côlon. Ainsi, nous proposons de générer une lignée murine génétiquement modifiée pour permettre la production d'une protéine fluorescente verte (GFP pour green fluorescent protein) uniquement dans les cellules intestinales et le colique. L'ensemble de l'épithélium intestinal et colique sera alors vert. Le recours à un composé chimique hautement mutagène (AOM/DSS) pour cet épithélium générera des polypes coliques. Ces derniers étant verts, nous pourrions suivre à différents moments de la tumorigénèse la dissémination des cellules tumorales vertes dans le sang mais aussi dans les organes à distance tels que le foie et les poumons.

Dans le cadre de la règle des 3R, le nombre d'animaux a été réduit au minimum après calcul de l'échantillonnage nécessaire afin d'obtenir une puissance statistique satisfaisante et aussi bien les mâles et les femelles seront utilisés (réduire). Des mesures destinées à réduire la contrainte, la douleur et la souffrance des animaux ont été prévues comme le suivi régulier des animaux, l'injection d'analgésiques en cas de douleur, l'application des points limites (sang dans les fèces, prostration, pattes blanches) et enrichissement des cages avec de la sciure de peuplier, copeaux et briques de peuplier (raffinement). Enfin, pour pouvoir couvrir les différentes phases de la tumorigénèse nous prévoyons l'utilisation du nombre limité de 80 animaux (Contrôles compris) sur 1 an car de nombreuses expériences seront réalisées par culture cellulaire *in vitro* pour éviter au plus l'utilisation d'animaux (remplacement).

15676 Les progrès réalisés en biologie ont permis de faire évoluer les stratégies de prise en charge des pathologies chroniques vers une "médecine de précision". Cette approche qui a notamment révolutionné le domaine de la cancérologie, s'appuie sur l'analyse des caractéristiques génétiques et des facteurs environnementaux pour permettre un traitement et un suivi individualisé des patients. Dans le domaine de la greffe d'organe, tout ceci a été rendu possible grâce au développement de l'arsenal thérapeutique (médicaments immunosuppresseurs,). Cependant, des progrès restent encore à faire pour améliorer la survie, prévenir la perte des greffons et diminuer les effets indésirables des traitements des patients transplantés.

Parmi les pistes envisagées l'étude des modifications du microbiote dues à la toxicité digestive de certains traitements comme l'acide mycophénolique, semble être une piste possible d'amélioration de la survie à long terme du greffon et la qualité de vie des patients.

La première étape de ce projet s'intéresse à l'étude du microbiote chez des souris soumises à différentes stratégies thérapeutiques. L'objectif est de prévenir les effets indésirables gastro-intestinaux de l'acide mycophénolique utilisé dans la plupart des protocoles de prise en charge des patients transplantés. La diversité du microbiote intestinal sera étudiée dans les fécès des animaux. La deuxième étude permettra de mettre en évidence le rôle des acides gras à chaînes courtes pour la prévention des dysbioses du microbiote intestinal dans un modèle de greffe chez la souris.

L'ensemble du projet nécessite l'utilisation de 252 souris adultes; il répond aux exigences des 3R, à savoir

-Remplacer les modèles *in vitro* actuellement disponibles, ne permettent pas de modéliser les interactions entre le microbiote intestinal pour un individu donné. La communauté bactérienne qui constitue le microbiote peut varier selon un grand nombre de facteurs liées à l'histoire du patient, ainsi qu'à son environnement : traitements, alimentation Ainsi les modèles animaux sont une

alternative permettant l'étude du microbiote intestinal dans des conditions environnementales contrôlées et standardisées.

-Réduire compte tenu de la variabilité interindividuelle et des différentes investigations pharmacologiques prévues dans ce projet, nous utilisons des lots de 12 souris; ce nombre est le minimum pour des interprétations statistiques fiables dans notre modèle expérimental. L'utilisation rationnelle de modèles animaux est parfaitement maîtrisée par les personnes impliquées dans ce projet.

-Raffiner : les animaux sont élevés dans des conditions d'hébergement (température et hygrométrie de l'environnement, densité d'animaux, présence systématique d'enrichissement, changement régulier de la litière, nourriture et eau ad libitum, surveillance quotidienne de l'état général des animaux) qui respectent leur bien-être. Un suivi quotidien du poids et de l'état général permettra de détecter l'apparition de signes de souffrance chez les animaux, conduisant éventuellement à leur exclusion du protocole. De plus, l'ensemble des procédures sera réalisé de manière à limiter le stress et la souffrance des animaux en utilisant des protocoles anesthésiques et analgésiques adaptés à la souris.

En conclusion, ce projet permet d'envisager des bénéfices importants dans le suivi des patients transplantés et de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques en transplantation.

15677 Les maladies parodontales sont des pathologies inflammatoires d'origine infectieuse conduisant à la destruction irréversible du parodonte. Ces pathologies sont très fréquentes et peuvent affecter tous les individus, quel que soit leur âge. En France, selon l'enquête ICSII réalisée par l'ADF sous l'égide de l'OMS, plus de 80 % des adultes entre 35 et 44 ans souffrent de maladies parodontales. Beaucoup estiment à tort cette situation inéluctable et se résignent à porter vers 60 ans un "dentier". Des études récentes mettent en évidence les rapports entre maladie parodontale et santé générale. Ainsi, les femmes enceintes qui présentent une parodontite sévère ont un risque accru (3 à 7 fois) d'accoucher prématurément d'un enfant à faible poids. De même, les patients atteints de parodontite ont un risque d'atteinte cardiovasculaire accru de 25 %.

Les parodontites représentent un véritable enjeu de santé publique. A ce jour, nous manquons de connaissances pour comprendre 1- pourquoi certains individus développent des parodontites, 2- comment la parodontite peut influencer sur des pathologies à distance, 3- comment moduler l'inflammation pour traiter la parodontite, 4- quels biomarqueurs nous permettraient de suivre la parodontite.

Notre objectif est d'étudier les mécanismes de la destruction parodontale en réponse à une infection bactérienne dans un modèle de parodontite expérimentale chez la souris. Il n'existe pas d'autres méthodes alternatives (*in vitro*, *in silico*) pour l'étude des maladies parodontales et la souris est l'espèce la plus couramment utilisée pour l'étude de cette maladie. Notre travail vise à identifier des biomarqueurs pour dépister et suivre les patients atteints de parodontite, et déterminer des cibles thérapeutiques potentielles.

Pour cela, nous allons induire une parodontite expérimentale en insérant un fil seul ou un fil imprégné de bactéries hautement pathogènes entre la dent et la gencive chez l'animal anesthésié. Le fil irrite la paroi interne de la gencive et favorise la pénétration des bactéries buccales et l'inflammation chronique du parodonte. Nous comparons la réponse inflammatoire et la destruction du parodonte conduite par le fil seul et celle induite par le fil imprégné de bactéries pour étudier le rôle plus spécifique de l'infection dans la destruction du parodonte. Un suivi longitudinal de la perte osseuse induite sera réalisé par imagerie. Les animaux seront anesthésiés pour éviter toute souffrance. Des antalgiques sont prévus et des points limites ont été établis entraînant la mise à mort anticipée si nécessaire. Le nombre de souris a été réduit au minimum. Vingt quatre souris seront nécessaires.

15678 A partir d'un certain stade, de nombreuses maladies sont associées à une perte excessive de poids corporel due notamment à une fonte musculaire (états cataboliques). On observe également des déséquilibres des taux de différents acides aminés dans le plasma et certains tissus. La perte de

muscle contribue fortement à la détérioration de la santé du patient et compromet les traitements. En effet, en plus de sa fonction principale dans la locomotion et la posture, en cas d'urgence le muscle peut fournir des acides aminés aux autres organes (principalement les viscères) par la dégradation des protéines qu'il contient. De plus, les situations cataboliques sont très souvent associées à une perte d'appétit (anorexie associée à la maladie) qui contribue à cette dégradation par manque d'apport alimentaire. Une perte musculaire durable et non-contrôlée altère les mouvements et diminue l'autonomie, mais elle a également des conséquences métaboliques néfastes. L'élaboration de stratégies visant à prévenir ou à limiter la perte de protéines musculaires peut donc contribuer à améliorer la santé des patients, à maintenir la qualité de vie et l'autonomie et à réduire les coûts de soins de santé. C'est un défi majeur, d'autant plus qu'il n'existe à ce jour aucun traitement efficace pour prévenir ou limiter la fonte musculaire.

L'objectif de nos travaux de recherche est de développer des stratégies pharmacologiques et nutritionnelles pour prévenir et/ou atténuer les états cataboliques, en limitant les dérégulations de l'homéostasie protéines/acides aminés par une inhibition de l'atrophie musculaire, une préservation des viscères et une amélioration de la consommation alimentaire. Nous étudions notamment les mécanismes moléculaires impliqués dans le maintien de l'homéostasie des protéines/acides aminés et leurs dérégulations. Pour cela nous avons largement recours à des modèles génétiquement modifiés, que ce soit au niveau de cellules en culture ou de modèles murins. Le modèle de la souris nous permet d'accéder à une approche intégrée pour l'étude de la régulation de l'homéostasie des acides aminés, prenant en compte la complexité de l'organisme entier, notamment les échanges entre organes. Les modifications génétiques nous permettent notamment, dans différents modèles nutritionnels et/ou pathologiques, 1) d'évaluer l'importance du rôle joué par différents acteurs en supprimant les gènes les exprimant 2) de mesurer le niveau d'activation de certains mécanismes spécifiques grâce à l'expression d'un gène rapporteur exogène (luciférase). Nous avons choisi comme modèle la souris C57BL/6JRj pour les raisons suivantes la disponibilité des modèles génétiquement modifiés, la disponibilité des outils moléculaires, le temps de génération réduit et la bonne connaissance du métabolisme.

Ces travaux impliquent plusieurs scientifiques, ingénieurs et techniciens et feront également l'objet de trois thèses qui débiteront à la rentrée 2019. Ils ont fait l'objet de plusieurs demandes d'autorisation de projets utilisant des animaux à des fins scientifiques qui ont été validées (certaines demandes seront également prochainement soumises). La présente demande concerne uniquement la partie « Identification et génotypage des souris transgéniques ». Ces lignées sont ou seront maintenues en élevage dans notre animalerie. Leur nombre est actuellement de 10 et augmentera dans les 5 prochaines années. L'identification et le génotypage de toutes les souris générées est indispensable pour leur utilisation dans les expérimentations. Par ailleurs, l'entretien de ces lignées nécessite ponctuellement des périodes d'amplification/sélection visant (1) à maintenir le fond génétique C57BL/6JRj et (2) à obtenir des individus double homozygotes dans les systèmes Cre-Lox. Le nombre total d'animaux générés devrait avoisiner 7000 souris pour 20 lignées différentes (certaines sont/seront utilisées très ponctuellement) sur une durée de 5 ans. Ces prévisions pourront être revues à la baisse car la mise en place de certaines expérimentations sera conditionnée par les résultats obtenus pour d'autres. Néanmoins si le nombre total d'animaux devait excéder 7000, une demande d'avenant sera déposée.

Les dispositions prises pour l'application de la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner) pourront présenter des spécificités dans les différentes demandes d'autorisations de projets utilisant des souris génétiquement modifiées (se référer à ces différentes DAP). Néanmoins les mesures suivantes seront communes.

- Remplacer Dès que cela est possible nous utilisons des modèles cellulaires. Le modèle animal reste indispensable pour accéder à une approche intégrée pour l'étude de la régulation de l'homéostasie des acides aminés, prenant en compte la complexité de l'organisme entier, notamment les échanges entre organes.

- Réduire Nous prévoyons le nombre d'animaux nécessaire et suffisant pour répondre aux différentes questions scientifiques, permettre en amont les périodes de sélection génétique par croisements successifs et garder une puissance statistique dans le traitement de nos résultats.

- Raffiner Au cours des phases d'élevage et d'expérimentation, chaque animal bénéficie d'une attention quotidienne et de soins de qualité par du personnel qualifié afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de sa vie. En élevage, les souris sont de 1 à 5 par cage et un matériel d'enrichissement est systématiquement présent (tubes, boules, coton pour les portées). Les animaux isolés sont uniquement les mâles en post-reproduction. Au cours des expérimentations, une attention particulière est portée aux animaux, par le personnel de l'animalerie et par les expérimentateurs. Les souris sont adaptées à leur environnement avant l'expérimentation et leur poids corporel et leur niveau de prise alimentaire sont régulièrement mesurés. Les conditions d'élevage et de mise en œuvre des procédures sont optimisées de manière à réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'angoisse subie par les animaux.

15679 La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative qui survient avec l'âge et qui affecte presque 8% des personnes de plus de 60 ans. La maladie se caractérise par une difficulté à initier les mouvements et s'avère très invalidante pour les patients et leur entourage. Un traitement existe pour cette maladie, mais il occasionne des effets secondaires qui sont eux aussi très invalidants après seulement quelques années de traitement. Il y a donc des recherches actives pour trouver de nouveaux traitements permettant de freiner l'évolution de la maladie et ainsi en diminuer les symptômes. Dans ce contexte, notre laboratoire est expert dans l'étude de la nutrition comme un facteur primordial pour maintenir le cerveau en bonne santé et notamment prévenir les troubles neurodégénératifs liés à l'âge. Dans la littérature scientifique, la vitamine A, une vitamine indispensable présente dans les produits laitiers et la viande, apparaît comme pouvant jouer un rôle important dans la maladie de Parkinson, mais les mécanismes sont encore peu connus. Avec l'âge, l'organisme métabolise moins bien la vitamine A, ce qui conduit à une carence en vitamine A pour les organes cibles tels que le cerveau. Ainsi, la carence en vitamine A survenant avec l'âge pourrait être un facteur important pour le développement de la maladie de Parkinson. Notre projet vise à comprendre comment une carence en vitamine A peut contribuer à la survenue de la maladie de Parkinson. Par ailleurs, nous étudierons comment une supplémentation en vitamine A peut contre-carrer le développement de la maladie, mais ceci fait l'objet d'une autre étude.

Dans cette étude, nous allons utiliser une technologie moderne et puissante permettant d'enregistrer l'activité électrique des cellules du cerveau (neurones) chez des rats contrôles ou carencés en vitamine A. Cette approche nous permettra d'identifier l'impact fonctionnel de la carence en vitamine A sur les structures cérébrales altérées dans la maladie de Parkinson. Pour cela, nous utiliserons des rats mâles de laboratoire que nous implanterons de manière chronique avec des électrodes permettant d'enregistrer l'activité électrique de leurs neurones. Les rats seront nourris avec un régime standard ou carencé en vitamine A, dès leur sevrage à l'âge de 3 semaines. Lorsque les rats seront adultes, l'activité électrique de leurs neurones sera enregistrée par un système d'électrodes implantées par chirurgie sous anesthésie générale.

Tout au long du projet, nous veillerons à respecter la règle des 3R. Le nombre d'animaux sera minimisé (30 rats sur 2 ans), puisque pour chaque animal, nous procéderons à des enregistrements sur plusieurs mois pour acquérir un maximum de données par animal. Les animaux seront hébergés par paire avec un congénère et ils bénéficieront d'un enrichissement comportemental. Leur état de santé sera vérifié quotidiennement et ils seront pesés une fois par semaine. Lorsque nécessaire (chirurgie), les animaux seront sédatisés avec administration d'un anti-douleur et d'un anti-inflammatoire. Ce projet est fondamentalement un projet de physiologie intégrée étudiant l'impact de la nutrition sur le fonctionnement cérébral, il n'existe donc pas de méthode alternative ou substitutive adaptée aujourd'hui. En effet, les cellules en culture ne forment pas de réseaux de neurones représentatifs de la réalité physiologique et nous n'avons pas encore suffisamment de données dans la littérature pour utiliser des modèles informatiques.

Cette étude de recherche fondamentale apportera des connaissances importantes sur l'implication de la vitamine A dans la physiopathologie de la maladie de Parkinson et pourra ouvrir la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques pour traiter la maladie et en ralentir la progression.

15680 Les transfusions de globules rouges ou de plaquettes peuvent induire des modifications du système immunitaire des patients transfusés. Ces atteintes du système immunitaire peuvent mettre en jeu la vie de ces patients. La plus connue de ces modifications est une stimulation du système immunitaire avec l'induction d'anticorps dirigés contre les globules rouges ou contre les plaquettes.

L'apparition de ces anticorps peut induire des impasses transfusionnelles avec l'impossibilité de trouver des produits sanguins compatibles, ce qui a pour conséquence de mettre en jeu le pronostic vital des patients. Heureusement tous les patients transfusés ne produisent pas ces anticorps et les mécanismes exacts de l'apparition ou non de ces anticorps restent encore à préciser.

Paradoxalement, les transfusions pourraient aussi inhiber les réponses immunes du patient transfusé. Cette inhibition a été décrite entre 1970 et 1980 suite à des transfusions lors de transplantations rénales. Ces transfusions ont eu un effet immunosuppresseur permettant de faciliter la greffe rénale. Cet effet a également été observé chez des patients atteints de tumeurs et transfusés. Ces transfusions peuvent induire une augmentation de la taille de la tumeur et faciliter le développement de métastases. Ce syndrome est d'autant plus problématique que des transfusions thérapeutiques ou prophylactiques sont nécessaires dans le cadre du traitement de ces pathologies.

En France, ces complications ont été réduites en supprimant les globules blancs des produits transfusionnels. Malheureusement, ces complications demeurent et sont un problème de santé publique. Cependant, les produits transfusionnels ne contiennent pas que des globules rouges ou des plaquettes. En effet, ils sont riches en vésicules extracellulaires (VE) issues du bourgeonnement des cellules présentes dans le sang circulant. Ces VEs peuvent être d'origine cellulaires différentes et font entre 200 et 900 nm. Ces VEs sont présentes dans les concentrés sanguins que l'on transfuse et aujourd'hui il n'existe aucun moyen technique de les retirer.

Nous avons pu démontrer avec d'autres équipes que ces VEs ont des propriétés très importantes sur le système immunitaire. En fonction de leur origine cellulaire et de leur quantité, elles peuvent le stimuler ou l'inhiber *in vitro*.

Par ailleurs, un produit transfusionnel fraîchement préparé pourrait ne pas avoir les mêmes propriétés sur le système immunitaire que des produits conservés. Avec d'autres équipes, nous avons montré que le contenu en VEs des produits transfusionnels peut changer au cours de leur conservation. Aussi nous faisons l'hypothèse que les VEs pourraient être à l'origine des effets de la transfusion sanguine sur le système immunitaire. C'est pourquoi nous proposons d'évaluer le rôle des transfusions de globules rouges ou de plaquettes, mais également de VEs sur la croissance de tumeurs. Cette étude transfusionnelle ne pouvant être réalisée chez l'homme ou *in vitro*, nous proposons l'utilisation d'un modèle murin de transfusion et de greffe tumorale sous-cutanée.

Cette étude est proposée sur 3 ans et demandera l'inclusion de 1480 souris. Des souris recevront une greffe de cellules tumorales sous la peau. D'autres souris permettront de créer des produits transfusionnels (plaquettes et VEs) qui serviront à transfuser les souris greffées. L'effet de ces transfusions sur la croissance tumorale et la réponse immune anti-tumorale sera alors étudiée.

Tout au long de nos expériences la règle des 3R sera respectée. Nous utiliserons le plus petit nombre d'animaux nécessaire pour avoir une bonne puissance statistique afin de répondre aux questions posées. Afin de limiter l'utilisation des animaux, nous exploiterons au maximum chaque souris. Toute la procédure expérimentale a été pensée afin de réduire le stress des animaux. Par ailleurs, la préparation des produits transfusionnels a été optimisée afin de réduire le nombre de souris donneuses.

De plus, nous avons mis en place toutes les mesures afin de réduire la douleur des animaux pendant les procédures expérimentales. Les injections sous-cutanées ne dépasseront pas 5 secondes entre le moment où la souris est appréhendée, injectée et est remise dans sa cage. Par ailleurs, nous utiliserons un gel anesthésiant de lidocaïne pour anesthésie de surface avant greffe tumorale. Pour les injections intraveineuses, celles-ci ne dépasseront pas 10 secondes. Les souris n'auront subi aucune autre procédure ou injection de la journée avant celle-ci. Pour tous prélèvements sanguins, les animaux seront préalablement anesthésiés avec une association de kétamine et xylazine.

Nous veillerons quotidiennement au bien-être des animaux en enrichissant leur milieu avec des maisonnettes et de la laine de bois et réaliserons une observation quotidienne pour suivre leur stress et leur état de santé. Nous contrôlerons ainsi qu'il n'y a aucune hyperactivité ou isolement des animaux, de perte anormale de poids ou l'absence d'autres signes (poil hérissé ou dos vouté). Par ailleurs, nous contrôlerons la croissance tumorale de façon journalière afin de limiter la taille de la tumeur à 5mm de diamètre maximum.

15681 Les effets des perturbateurs endocriniens sont observés depuis des décennies. Les perturbateurs endocriniens (PE) sont définis par l'OMS comme des substances ou des mélanges exogènes possédant des propriétés dont l'on peut attendre qu'elles conduisent à une perturbation endocrinienne sur un organisme intact ou sa descendance. L'agence européenne des produits chimiques (ECHA) et l'Autorité européenne pour la sécurité des aliments (EFSA) ont publié un guide définissant les moyens d'évaluer le caractère perturbateur endocrinien des substance ou mélanges « Guidance for the identification of endocrine disruptors in the context of Regulations (EU) No 528/2012 and (EC) No 1107/2009 »

Dans ce contexte, l'étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération chez le médaka (MEOGRT) suivant la ligne directrice OCDE 240 ou une méthode équivalente peut être utilisée. L'étude MEOGRT est un essai complet d'exposition sur plusieurs générations chez le poisson visant à obtenir des données pouvant servir à l'évaluation des dangers et des risques pour l'environnement liés aux produits chimiques, en particulier les produits suspectés d'être des PE. L'exposition dans le test MEOGRT est poursuivie jusqu'à l'éclosion (jusqu'à deux semaines post-fécondation) dans la seconde génération (F2). Cet essai peut être utilisé pour l'évaluation des effets chroniques potentiels des produits chimiques, notamment ceux susceptibles d'avoir des effets perturbateurs sur le système endocrinien, chez le poisson. La méthode décrite vise principalement à mettre en évidence des effets potentiels pertinents au niveau d'une population (à savoir des impacts indésirables sur la survie, le développement, la croissance et la reproduction). Dans cet essai, des poissons sexuellement matures sont exposés pendant 3-4 semaines. A partir des oeufs produits la génération F1 est élevée pendant 15 semaines, les œufs produits par la génération F1 sont ensuite exposés jusqu'à la fin de l'éclosion.

Dans le cadre de cet essai, un test complet nécessite au maximum 108 poissons à la génération F0 et 1080 poissons à la génération F1 soit 1188 poissons par test.

Le nombre maximum de poissons sur 5 ans sera de 11880 poissons (dans le cas ou 2 substances sont testées par an sur 5 années)

Le guide définit une approche par niveau des tests à réaliser. Ainsi, dans un premier temps, la substance ou le mélange est évalué(e) à l'aide de méthode *in vitro*. L'essai OCDE 240 est réalisé dans le cadre de demande des autorités pour la confirmation ou non du caractère perturbateur endocrinien.

Dans un but de réduction du nombre d'animaux utilisés, la ligne directrice préconise l'utilisation au maximum de 5 concentrations de la substance d'essai. Dans un contexte de raffinement, les poissons seront maintenus dans un environnement permettant une croissance optimale en termes de qualité d'eau et d'alimentation.

15682 Les glioblastomes de grade IV (GBM) sont des tumeurs astrocytaires malignes très invasives, particulièrement résistantes aux thérapies actuelles. La médiane de survie des patients reste très faible (de l'ordre de 15 à 18 mois). Les traitements actuels (exérèse chirurgicale associée à la radiothérapie et une chimiothérapie adjuvante utilisant le témozolomide) donnent des résultats cliniques faibles. Il est urgent de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques et d'identifier de nouveaux marqueurs prédictifs et pronostiques de la réponse aux traitements pour améliorer le devenir de ces patients.

Nous avons récemment mis en évidence une relation directe entre l'expression d'un ganglioside A2B5, et la prolifération et la migration cellulaire *in vitro* sur plusieurs lignées de GBM, mais aussi

in vivo. Ces résultats démontrent le rôle crucial d'A2B5 dans la croissance du GBM. A2B5 constitue ainsi une cible thérapeutique prometteuse dans la thérapie du GBM.

Nous avons par ailleurs montré qu'une enzyme, la neuraminidase, est capable *in vitro* de bloquer l'expression d'A2B5 au niveau de cellules de GBM et d'inhiber en conséquence la prolifération et la migration de ces cellules. De plus, cet effet antiprolifératif et antimigratoire est plus important lorsque A2B5 est sur-exprimé.

Afin de confirmer *in vivo* l'effet anti-tumoral de la neuraminidase sur les cellules de GBM exprimant A2B5, nous grefferons localement (voie orthotopique intracrânienne) des cellules de GBM normales ou sur-exprimant A2B5 dans un modèle de souris Nude, puis les animaux seront traités ou non avec la neuraminidase (injections intratumorales). Nous évaluerons alors l'efficacité du traitement sur les animaux porteurs de tumeurs de GBM sur-exprimant A2B5 ou non, en suivant la progression de la pathologie dans les différents groupes en mesurant le poids des animaux tous les jours et en observant tout changement dans leur comportement ou l'apparition de signes cliniques. L'effet sur le volume tumoral et l'expression de certains marqueurs histologiques seront analysés après dissection des cerveaux.

Dans le souci du respect de la règle des 3R, une anesthésie durant la chirurgie et une analgésie post-opératoire seront mises en place. Afin de minimiser le nombre d'animaux utilisés, un maximum d'expériences sera réalisé *in vitro*. Le nombre d'animaux prévu dans chaque groupe est basé sur un calcul d'effectif permettant de prédire que nous avons 80% de chance d'obtenir un résultat statistiquement significatif. La détection de toute souffrance de l'animal sera assurée et le niveau de souffrance évalué en fonction d'une grille de score. Les animaux seront euthanasiés dès l'apparition d'un signe de détresse (perte de poids supérieure ou égale à 20% du poids initial, posture, prostration, difficultés à respirer, à se déplacer, ataxie). Pour le bien-être de l'animal, les souris seront logées selon les normes requises avec un enrichissement (copeaux de bois, dômes) et en groupes de 5 individus par cage afin d'éviter le stress de l'isolement. Au total, un maximum de 115 souris est prévu pour la globalité de l'étude.

15683 Les animaux transgéniques, dont le matériel génétique a été modifié, sont créés pour différentes raisons étudier des maladies, aider à mieux comprendre la physiologie et le développement d'organismes mammifères, tester la sécurité des vaccins, ou encore produire des protéines recombinantes (protéines produites par une cellule dont le matériel génétique a été modifié par recombinaison génétique) permettant de soigner des patients atteints de maladies génétiques.

La création de lignées d'animaux transgéniques nécessite la récupération d'embryons qui sont par la suite génétiquement modifiés (le plus souvent par micro-injection d'un fragment d'ADN) et transférés dans l'utérus de femelles receveuses, permettant la naissance d'animaux avec les caractéristiques souhaitées. Afin d'optimiser le nombre d'ovocytes produits par lapine, qui n'ovule que lors du coït, nous soumettons nos lapines à une procédure de superovulation (traitement hormonal de la lapine pour obtenir un nombre d'ovocytes supérieur à la normale). Les ovocytes, fécondés par les spermatozoïdes, deviennent des embryons au stade 1 cellule et sont récupérés 19 heures après le coït (avant fusion des noyaux de l'ovule et du spermatozoïde). Ce protocole de superovulation nous permet d'obtenir en moyenne 32.8 embryons par femelle, sachant qu'une gestation naturelle produit une douzaine de lapereaux en moyenne. Cette procédure expérimentale nous permet déjà de diminuer le nombre d'animaux utilisés et de suivre la règle des 3R. C'est dans l'amélioration constante de cette règle que ce projet est présenté.

Notre projet de création de lignées génétiquement modifiées, inductibles et optimisées pour augmenter encore plus la production d'ovocytes, se base sur l'action d'un antisérum qui neutralise une hormone, l'inhibine, qui régularise l'action de l'hormone folliculostimulante (FSH) sur la maturation des ovocytes. Selon la bibliographie scientifique, l'administration de cet antisérum anti-inhibine a permis d'augmenter le nombre d'ovocytes ovulés chez la jument, la rate et la souris.

L'administration d'un antisérum commercial contre l'inhibine est inapplicable chez la lapine en raison d'un volume trop important à injecter (jusqu'à 45 ml selon les travaux effectués chez la souris) qui ne respecterait pas le bien-être animal. C'est pour cette raison que nous souhaitons créer des

lapines génétiquement modifiées dont le niveau d'inhibine ne pourra être diminué qu'avec un traitement spécifique au moment du protocole de superovulation.

Comme la production d'ovocytes sera augmentée, cette procédure nous permettra de réduire au moins de moitié le nombre de lapines donneuses d'embryons. Ces embryons seront alors utilisés pour nos projets en cours pour la production de protéines thérapeutiques dans le lait de lapines.

Nous souhaitons dans l'avenir mettre à disposition ces animaux pour des laboratoires qui seraient intéressés par la création de lapins génétiquement modifiés ou par la sauvegarde de lignées par cryopréservation, et contribuer ainsi à la réduction du nombre de lapines donneuses d'embryons utilisées par la communauté scientifique.

Remplacement il n'existe pas de méthode de remplacement pour créer des animaux transgéniques et le lapin est l'espèce de choix pour atteindre nos objectifs de production de protéines recombinantes dans le lait de lapines transgéniques. Le lapin a une courte période de gestation (30 jours), une maturation sexuelle rapide (4 à 5 mois), un volume de lait important (jusqu'à 10 litres/an/femelle). En tant que mammifère, la lapine synthétise des protéines recombinantes complexes (avec glycosylation et gamma carboxylation), qui sont nécessaires pour soigner efficacement les patients, de l'ordre de centaines de milligrammes à plusieurs grammes de litres de lait, que l'on ne peut obtenir en qualité et en quantité par d'autres systèmes d'expression (bactéries ou levures).

Réduction la réduction à venir du nombre d'animaux utilisés est l'objectif même de cette demande d'autorisation de projet mais en parallèle, les lapines reçoivent un traitement de superovulation (qui augmente le nombre de follicules ovulés) et permet de réduire le nombre de femelles donneuses d'embryons (une femelle peut mettre bas jusqu'à 12 petits alors que des femelles superovulées produisent 32.8 embryons en moyenne), soit 2.7 fois plus d'embryons.

Remplacement les lapins mâles achetés chez des éleveurs agréés et utilisés comme reproducteurs sont remplacés auprès de l'association White Rabbit lorsque leurs performances reproductrices diminuent.

Nous organisons nos expérimentations (récupération des embryons, transgénèse et transfert d'embryons potentiellement transgéniques dans des lapines receveuses) de façon à pouvoir réutiliser les lapines receveuses non gestantes comme donneuses d'embryons, ce qui permet de réduire le nombre total d'animaux utilisés d'un tiers.

Raffinement les procédures expérimentales seront faites sous anesthésie locale ou générale et les animaux recevront des anti-inflammatoires pendant les procédures de sévérité modérée.

Pour ce projet, nous prévoyons d'utiliser 552 lapines. Nous estimons pouvoir au moins doubler la production du nombre d'ovocytes par lapine et réduire le nombre d'animaux que nous utiliserons pour les projets en cours et pour tous les projets à venir de 50% dans l'avenir, sur la base des résultats qui ont été publiés sur les souris.

La durée de ce projet est estimée à 5 ans.

- 15684** Le but de ce projet est d'évaluer une potentielle amélioration du phénotype d'un modèle murin de la myopathie à agrégats tubulaires grâce à une approche thérapeutique. Notre travail est axé sur les maladies génétiques rares affectant les muscles. Pour comprendre le rôle physiologique des gènes touchés dans la myopathie à agrégats tubulaires, on a d'abord utilisé des modèles cellulaires puis des modèles animaux murins. Grâce à ces deux modèles nous avons pu établir les causes de cette maladie ainsi que de possibles cibles thérapeutiques. Nous planifions à présent, d'utiliser un modèle murin pour mieux comprendre la physiopathologie de la maladie et valider les cibles thérapeutiques qui ont déjà été sélectionnées *in vivo*. Pour ce projet il y aura 3 lignées 1 lignée qui est atteinte de la myopathie à agrégats tubulaires, une lignée portant une mutation dans un gène d'intérêt (cible thérapeutique) et 1 lignée dont l'expression d'un gène d'intérêt est réduite de 50% (cible thérapeutique). Nous allons croiser la première lignée avec les 2 autres lignées afin de démontrer que toucher la cible thérapeutique permet d'améliorer le phénotype du modèle murin de la myopathie à agrégats tubulaires. L'utilisation des souris est indispensable pour étudier la

physiopathologie de la maladie et l'amélioration du phénotype car ceci pourrait être transféré à l'humain.

Les souris seront analysées *in vivo* / *in situ* / *in vitro* et les tissus seront prélevés pour des expériences *in vitro* ultérieures. Nous avons préalablement utilisé des modèles murins pour cette maladie afin de déterminer les molécules qui pourraient être testés *in vivo* dans la souris pour réduire le nombre d'animaux. Par contre, seulement le modèle murin permet d'étudier l'amélioration des signes de la maladie dans plusieurs tissus (REMPACEMENT). Plusieurs procédures expérimentales (maximum une par jour) seront réalisées chez les mêmes souris, pour réduire le nombre total de souris (REDUCTION). 15 souris au maximum / groupe sera utilisé pour s'assurer que l'étude soit statistiquement et scientifiquement valable. Afin de s'assurer que les souris ne souffrent pas, les souris seront surveillées quotidiennement pour éviter toute souffrance. Tout signe de douleur sera pris en charge en prenant les mesures appropriées en fonction du niveau de douleur observé (soit un analgésique sera administré, soit les animaux seront retirés de l'étude) (RAFFINEMENT). Un maximum de 635 souris sera utilisé.

15685 Le développement du cerveau est un processus complexe qui débute *in utero*. Des perturbations de ce processus peuvent conduire à des pathologies neurodéveloppementales telles que les troubles du langage, de l'apprentissage, de l'attention ou encore du spectre autistique. Certains composés de notre environnement sont fortement suspectés d'affecter ce développement cérébral comme les bisphénols A, F, S et B, les phtalates et le méthylparaben. Il est important de caractériser leurs effets plus en détail sur le développement cérébral seuls et/ou associés en cocktail. D'autre part, des études convergentes chez l'humain et chez l'animal montrent que les performances cognitives (mémoire, apprentissage) chez l'enfant peuvent être améliorées par l'activité physique réalisée par les mères pendant la gestation. Nous faisons l'hypothèse qu'un programme d'exercice physique pendant la gestation pourrait limiter les effets délétères d'un cocktail de polluants environnementaux sur le développement cérébral de la descendance. Pour cela, nous déterminerons les effets de ces polluants 1) sur la structure et la connectivité cérébrales en utilisant l'IRM et 2) sur le comportement des animaux, issus de la 1^{ère} et de la 3^{ème} génération, avec et sans exercice physique maternel. Cette étude permettra de déterminer si ce cocktail de polluants présent dans notre environnement a un effet neurotoxique transmissible à la génération suivante et si l'exercice physique de la mère pendant la gestation permet de contrecarrer cet effet. Nous utiliserons comme modèle animaux des rats wistar et 432 animaux seront nécessaires pour ce projet dont la durée est de 5 ans

Ce projet sera réalisé dans le principe du respect des 3R.

Réduction le nombre d'animaux nécessaire à cette étude (432 animaux) a été déterminé de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en en gardant suffisamment pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées. Le nombre d'animaux par groupe a été estimé sur la base d'études publiées. Les expériences ont été planifiées (par rapport aux données bibliographiques et à nos résultats préalables) pour permettre la collecte d'un maximum d'informations à partir des individus étudiés.

Raffinement les animaux sont manipulés et suivis quotidiennement afin de prévenir toute douleur chez l'animal. Les animaux seront hébergés dans des cages homologuées avec de la nourriture *ad libitum*. Tous les personnels impliqués ont des compétences validées pour les manipulations des animaux. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à une grille codifiant le niveau de douleur. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance (notamment, suppression de la douleur grâce à l'administration d'antalgiques). Nous n'utilisons, pour répondre aux questions innovantes de ce projet, que des techniques non invasives comme l'IRM et le comportement. Les animaux devant être transportés à partir de leur animalerie d'origine vers celle où ont lieu les expérimentations, nous réduirons le stress dû au transport en les plaçant dans des cages de transport avec leur litière d'origine, de la nourriture et de quoi s'hydrater pendant le voyage (15 min). Ils seront laissés au repos 7 jours avant les expérimentations afin qu'ils s'adaptent à leur nouvel environnement.

Remplacement Aucun modèle *in vitro* ni computationnel ne permet d'atteindre les objectifs fixés notamment avoir une vision intégrée des conséquences de l'exposition aux polluants (voie d'entrée digestive essentiellement) et de l'entraînement (modification de la dépense énergétique) sur différents index ou marqueurs physiologiques et métaboliques. Le rat est un modèle approprié et bien validé.

15686 L'espèce bactérienne *Klebsiella pneumoniae* est placée au premier plan des pathogènes opportunistes responsables d'infections nosocomiales. *K. pneumoniae* est un organisme modèle particulièrement pertinent puisque cette bactérie est naturellement retrouvée à l'état commensal dans le tube digestif et les cavités naturelles de l'homme, mais également retrouvée associée à du matériel médical ou lors d'infections comme des bactériémies et des pneumonies. Sa capacité à coloniser le tractus digestif de l'hôte et à former des biofilms sur des dispositifs médicaux sont des éléments clés de sa pathogénicité. Dans le cadre d'infections liées aux biofilms, le processus de dispersion est également un mécanisme important car il permet la libération dans l'organisme de bactéries ayant une pathogénicité augmentée comparativement aux formes planctoniques, avec notamment une capacité de colonisation accrue des surfaces abiotiques et biotique. Les structures de surface comme les pili sont des facteurs de virulence connus pour jouer un rôle majeur dans la colonisation via le processus d'adhésion et les interactions des bactéries aux tissus de l'hôte. L'analyse du génome de *Klebsiella pneumoniae* a permis de mettre en évidence deux nouvelles structures de surface de type « chaperonne-usher », retrouvées surexprimées dans les bactéries dispersées du biofilm, mais dont le rôle dans le processus d'infection n'a pas encore été élucidé. Ce projet est structuré en deux objectifs expérimentaux visant à (i) caractériser ces deux systèmes de surface d'un point de vue moléculaire chez *Klebsiella pneumoniae* par des approches *in vitro* et (ii) d'évaluer leur implication à la fois dans le processus de colonisation mais également dans les mécanismes associés à la virulence et à la persistance via des approches *in vivo*. Le recours à l'animal est indispensable pour ce projet en effet, il n'existe actuellement pas de méthode alternative permettant d'évaluer de façon simultanée les capacités de colonisation des tissus, de virulence et de persistance dans un même organisme hôte. De plus, les modulations du système immunitaire ainsi que la présence d'un microbiote résident complexe ne peut en aucun cas mimée par des techniques actuelles. Les procédures et méthodologie utilisées seront optimisées de façon à réduire au maximum l'inconfort, la douleur ou l'anxiété subies par les animaux. Des analgésiques seront administrés aux animaux si nécessaire. Les expérimentations seront organisées de manière à obtenir des résultats statistiquement exploitables avec le plus faible nombre d'animaux possible, et chaque expérience sera exploitée au maximum. Le nombre maximal estimé d'animaux est de 285 souris sur une période 5 ans.

15687 Du fait du fort nombre de cas de cancers et d'une mortalité associée encore élevée, l'oncologie représente un enjeu scientifique et clinique très important. Dans le but d'identifier de nouveaux candidats médicaments, les chercheurs développent de nouveaux outils *in vitro* permettant de sélectionner et d'optimiser des composés. Afin de développer de nouvelles approches thérapeutiques, nous proposons la réalisation de modèles expérimentaux de tumeurs sous-cutanées chez la souris. Les modèles que nous proposons permettront d'évaluer l'effet bénéfique ou délétère de composés pharmacologiques dans un contexte pathologique d'échec thérapeutique. Nous développons de nouvelles approches thérapeutiques en oncologie ayant pour but de restaurer l'activité du système immunitaire et permettant ainsi un arrêt de la progression tumorale / l'élimination de la tumeur. Ces approches sont basées sur l'utilisation d'anticorps innovants ciblant une molécule impliquée dans l'échappement immunitaire tumoral. Dans cette optique, nous proposons les modèles dans une activité de recherche pré-clinique sur des composés thérapeutiques (déjà utilisés en clinique ou en cours de développement), avec un nombre de 20 études par an, comprenant 120 souris par étude (pour un total sur 5 ans à 12000 souris). Nous proposons donc d'évaluer, les propriétés de nouvelles molécules sur différents modèles murins bien décrits dans la littérature. Ces modèles sont basés sur l'implantation de cellules tumorales sur des souris de même fonds génétiques que les lignées cellulaires. Dans le cas particulier d'étude sur des lignées de cellules tumorales humaines, nous proposons aussi des modèles sur des souris

immunodéficientes. Les tumeurs sont des ensembles cellulaires complexes avec un fonctionnement de type « organe », c'est pourquoi l'utilisation de modèles animaux est justifiée et ne peut être substituée par de l'expérimentation *in vitro*. Ces expériences seront réalisées dans les meilleures conditions en respectant les règles de bioéthiques (grâce à l'utilisation d'analgésie, au recours à l'anesthésie) et conformément à la législation en vigueur. A ces fins, les composés testés auront été préalablement testés *in vitro*, afin de déterminer les doses à utiliser, de s'affranchir de la toxicité des composés et de limiter le nombre d'animaux. Les groupes sont de 20 animaux pour obtenir des tests statistiques robustes, évitant ainsi de réitérer une étude. Afin de réduire le nombre d'animaux, nous utilisons comme critère d'efficacité le suivi de la taille tumorale, mesurée soit à l'aide méthode physique ou par imagerie, et ceci dans le but de limiter les euthanasies. Les animaux des études sont hébergés dans des conditions veillant au respect de leur bien-être (en fratrie) et avec un milieu enrichi afin de limiter leur stress. Les animaux sont suivis quotidiennement afin de détecter tout inconfort ou souffrance. Une étroite collaboration entre le personnel de l'animalerie et notre équipe d'expérimentateurs permet d'intervenir immédiatement sur les animaux en cas de nécessité.

15688 En France, on compte 33000 nouveaux cas de cancer colorectal (CCR) par an, responsables de 16000 décès annuels. Malgré l'ampleur de cette pathologie les origines moléculaires de cette maladie restent encore mal comprises. En conséquence, un grand nombre de cas ne peuvent être efficacement soignés. Notre projet est focalisé sur la découverte de nouvelles molécules qui pourraient constituer des marqueurs diagnostique ou pronostique, ou des cibles thérapeutiques potentielles des cancers. Les modèles animaux de cancer colorectaux constituent des outils importants pour étudier le développement et la pathogenèse des CCR, et identifier des cibles thérapeutiques. Par exemple, les modèles animaux permettent de suivre/mimer la séquence des changements dans le comportement cellulaire et la biologie de la tumeur qui est observée chez l'homme. Enfin, les modèles animaux permettent aussi d'évaluer la réponse tumorale à de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Nous proposons d'évaluer le potentiel thérapeutique de Rpap3 (RNA Polymerase II Associated Protein 3) dans les cancers colorectaux. En conditions physiologiques, Rpap3 assemble des protéines en édifices fonctionnels (on parle de « complexes biologiques »). En particulier, nous avons montré que Rpap3 assemble la polymérase des ARN de type II (en anglais : RNA Polymerase II), elle-même responsable de la transcription des gènes en molécules d'ARN messagers. Rpap3 assemble aussi d'autres complexes impliqués dans la prolifération des cellules et la tumorigenèse colorectale. En collaboration avec des médecins, nous avons montré une surexpression de Rpap3 dans des biopsies de tumeurs coliques de patients. De plus, nos expériences d'inactivation en conditions physiologiques montrent que Rpap3 est indispensable à l'homéostasie de l'épithélium intestinal murin. Nous voudrions tester si Rpap3 pourrait être une cible pour soigner les cancers colorectaux. Pour cela, nous souhaitons invalider Rpap3 dans l'intestin, de façon conditionnelle, dans un modèle murin de tumorigenèse intestinale bien décrit. Ce modèle repose sur l'inactivation d'un gène connu pour son implication dans le cancer colorectal (lignée avec allèle *Apc3lox14*). Nous voulons mesurer si l'inactivation concomitante de Rpap3 diminue l'apparition de tumeurs (fréquence, taille et stade).

REMPACER Nous ne pouvons pas envisager l'utilisation d'organoïdes issus de cellules épithéliales intestinales pour étudier le rôle physiopathologique de Rpap3 au cours de la tumorigenèse. Nous utiliserons le modèle souris *mus musculus*, permettant l'inactivation de manière tissu-spécifique et inductible des gènes d'intérêt.

REDUIRE Le modèle d'induction génétique décrit dans cette étude a été abondamment utilisé par la communauté scientifique dans des schémas expérimentaux similaires au nôtre (allèle *Apc3lox14*). Compte-tenu des caractéristiques décrites pour ce modèle, le logiciel G*power définit à 12 le nombre de souris suffisant pour chaque groupe (un groupe contrôle et un groupe testé, de même sexe). Nous envisageons de répéter trois fois l'expérience ($n=3 \times 12 \times 2=72$). Cette étude utilisera donc 72 animaux. Les croisements ont été optimisés pour utiliser au maximum les animaux générés.

RAFFINER Toutes les dispositions ont été prises pour le raffinement des conditions d'élevage et d'expérimentation, en accord avec la structure du bien-être animal de l'animalerie (SBEA). Le bien-être animal est évalué quotidiennement et l'environnement des cages est enrichi par des abris en plastique. Les procédures expérimentales sont parfaitement définies et ont été publiées et validées par le comité de pilotage de l'animalerie de l'institut. Une expérimentatrice unique est en charge des manipulations (pesées, injections de tamoxifène) et du suivi des animaux afin de diminuer leur stress et détecter rapidement une éventuelle souffrance. Tous les intervenants sont formés et sensibilisés à l'évaluation de la souffrance animale, pour détecter et réduire la douleur, et limiter les variations expérimentales. Une fiche de suivi est établie pour chaque animal de la procédure expérimentale.

15689 La campylobactériose, maladie zoonotique, est un problème de santé publique mondial chez l'homme, important en Europe, aux États-Unis, en Australie et en Nouvelle-Zélande. Il s'agit d'une maladie d'origine alimentaire principalement due à la contamination de la viande de poulet par *Campylobacter* spp qui peut être transférée des animaux à l'homme par la consommation et la manipulation de la viande. Les espèces *Campylobacter* les plus importantes sont *C. jejuni* et *C. coli* qui peuvent induire divers signes cliniques tels que diarrhée, douleurs abdominales, fièvre, maux de tête, nausées et vomissements. Par conséquent, le portage asymptomatique de *Campylobacter* spp chez les volailles est une préoccupation majeure. *C. jejuni* colonise le tube digestif des poulets, mais n'est généralement pas pathogène dans des conditions normales. L'utilisation des antibiotiques, actuellement, est le principal moyen de lutte contre ces pathogènes. Cependant, dans les élevages avicoles, il reste trop important et conduit à l'émergence de résistance chez les bactéries pathogènes à risque pour la santé humaine, voire des bactéries du microbiote digestif de la volaille. Aujourd'hui, c'est toujours un problème en termes de santé publique et de consommation des aliments. L'utilisation de produits alternatifs aux antibiotiques est une priorité nationale, européenne et internationale. Une des stratégies pour réduire le portage asymptomatique de *C. jejuni* et ainsi réduire les risques de contamination, repose sur l'ajout d'additifs dans la ration des animaux pour intervenir sur différentes composantes du système digestif (ex. microbiote, structure intestinale, immunité locale). Cette démarche s'inscrit dans un objectif de réduction de l'utilisation d'antibiotiques en élevage volaille.

Ce projet visera à tester *in vivo*, deux combinaisons de composés qui auront préalablement été sélectionnés *in vitro*, en comparaison avec des animaux inoculés mais non supplémentés et des animaux inoculés et traités avec une solution thérapeutique. L'objectif sera donc de montrer une réduction de la charge bactérienne après une infection orale, sans altérer les performances des animaux sur une période de 15 jours. Les composés seront incorporés à des doses relatives aux additifs alimentaires. Ce projet nécessitera l'utilisation de 200 poulets de chair ROSS 308, mis en expérimentation à 1 jour de vie, dans le respect de la règle des 3Rs et afin de pouvoir caractériser l'efficacité des additifs alimentaires contre le portage asymptomatique de *C. jejuni*.

Réduction un screening *in vitro* sera réalisé préalablement à l'étude pour ne tester *in vivo* que deux composés ou deux combinaisons à une concentration déterminée qui ont montré des effets positifs (effet antibactérien ou/et anti-invasion). Le nombre d'animaux est calculé au plus juste à l'aide d'outils statistiques garantissant une puissance de test de 80% minimum en s'appuyant sur les données de la littérature et les premières données expérimentales obtenues sur le modèle infectieux dans de précédents projets.

Remplacement il n'existe aucune méthode alternative pour évaluer le portage asymptomatique de *Campylobacter jejuni* et ne peut être évalué *in fine* que sur l'espèce cible.

Raffinement il y aura un enrichissement social et de structure. Les enrichissements du milieu consisteront à mettre des petites pelotes de laine, des petites plaques métalliques suspendues à un fil et des petits perchoirs et les poulets seront hébergés au sol avec de la paille broyée.

15690 En France, les fragilités osseuses sont à l'origine de plus de 130 000 fractures par an entraînant d'importantes répercussions sur la qualité de vie et la mortalité. Les stratégies thérapeutiques actuellement disponibles présentent certaines restrictions d'usage ou ne sont pas efficaces sur

l'ensemble des sites fracturaires. De nouvelles solutions thérapeutiques sont clairement requises. Nos travaux antérieurs ont permis le développement de nouveaux analogues des hormones intestinales actifs pour réduire la fragilité osseuse chez le rongeur ovariectomisé. La poursuite du développement de ces molécules nécessite d'acquérir le profil pharmacocinétique (ADME) pour ajuster la dose et le mode d'administration de ces nouvelles molécules en vue d'un essai clinique humain futur.

Ce projet consiste en l'administration intraveineuse ou sous-cutanée, sous anesthésie générale gazeuse, d'une dose unique d'analogue chez le rat et au prélèvement, par l'intermédiaire d'un cathéter intraveineux, de 8 fois 100 µl de sang à 0, 15, 30, 60, 120, 240, 480 et 1440 minutes post-injection. La somme des volumes de sang prélevés sera inférieure à 10% de la volémie d'un rat. Des rats mâles (poids ≈400g) et femelles (poids ≈250g) âgés de 10 semaines seront utilisés. Les rongeurs sont recommandés par les agences de régulation du médicament (FDA, EMEA) comme première approche. Le rat présente une volémie plus importante que la souris permettant ainsi de réduire le nombre d'animaux nécessaire pour la réalisation des études de pharmacocinétique.

Cinq analogues différents seront testés dans ce projet. Trois doses sont requises pour évaluer le profil pharmacocinétique. Deux voies d'administration, intraveineuse et sous-cutanée, sont requises pour mesurer la biodisponibilité de la molécule. Les concentrations plasmatiques des analogues seront déterminés en duplicat à chaque temps par test ELISA. Les paramètres pharmacocinétiques suivants seront ensuite calculés T_{max}, C_{max}/C₀, biodisponibilité, T_{1/2}, clairance plasmatique, volume de distribution. A la fin de l'expérimentation, les animaux seront sacrifiés pour récupérer différents tissus (foie, rate, reins, cerveau, muscle strié squelettique, tissu adipeux, os du squelette axial et appendiculaire) afin de déterminer, par test ELISA, les concentrations tissulaires en analogues et ainsi déterminer la biodistribution des molécules testées.

Le nombre total d'animaux pour mener à bien ce projet a été estimé à 360.

Le projet est conforme à la règle des 3R. Le remplacement de l'utilisation d'animaux vivants n'est malheureusement pas possible pour les études de pharmacocinétiques visant à définir la biodisponibilité de molécules après injection. Le principe de réduction a été appliqué dans ce projet et le choix de l'espèce animale de rat participe à ce principe. Enfin, le principe de raffinement sera appliqué en hébergeant les animaux en groupes sociaux, dans un environnement adapté et enrichi, avec une surveillance quotidienne des animaux.

15691 De nombreuses études ont mis en évidence l'implication d'une surproduction de protéines inflammatoires (les cytokines) dans certaines maladies inflammatoires chroniques, telles que la polyarthrite rhumatoïde, l'arthrose ou encore la sclérose en plaques. Plus récemment, le rôle délétère de certaines protéines membranaires, les "immune checkpoints", a été mis en évidence dans certains cancers.

Depuis quinze ans, les principaux traitements sont constitués d'anticorps monoclonaux mais ceux-ci présentent un certain nombre d'inconvénients (effets secondaires, non réponse voire résistance, coûts élevés).

Notre projet a pour objectif de développer une stratégie alternative l'immunisation active. Celle-ci a pour but d'induire la production, par le patient, d'anticorps du "Soi" neutralisant la protéine impliquée. Aujourd'hui, plusieurs équipes s'intéressent à cette méthode et les premiers essais cliniques à partir d'une protéine entière (TNF, IFN, IL-1, etc.) confirment à la fois l'innocuité et l'efficacité de cette stratégie. Compte tenu des inconvénients possibles liés à l'utilisation d'une protéine entière comme immunogène, l'immunisation active à partir de fragments de protéine, appelés peptides a été développée. Ces peptides étant à la base non immunogène car appartenant au "Soi", ils sont couplés à une protéine porteuse étrangère.

L'utilisation des animaux est indispensable car nous souhaiterions développer à terme des vaccins permettant de traiter des maladies inflammatoires chroniques et/ou des cancers chez l'Homme.

Pour cela, l'immunogénicité des peptides sélectionnés ainsi que la capacité neutralisante des anticorps produits, doivent préalablement être validées chez l'animal.

L'immunogénicité de ce conjugué, c'est à dire sa capacité à induire la production d'anticorps dirigés contre la protéine entière ciblée, est évaluée chez la souris. Seuls les conjugués les plus immunogènes pourront ensuite être testés, pour leur effet protecteur, dans des modèles murins de maladies inflammatoires chroniques ou de cancers, dans lesquels la protéine ciblée est impliquée.

Notre projet s'étend sur 5 ans.

Des études de prédiction épitopique ainsi que des études d'analyses structurales *in silico* sont effectuées au préalable afin de limiter le nombre de peptides à tester chez l'animal (10 peptides au maximum par cible).

Nous avons travaillé avec un biostatisticien afin de définir le nombre nécessaire et suffisant d'animaux qui seront utilisés lors de ce projet. Le nombre total d'animaux sera de 2190 souris.

L'état général des animaux est vérifié 1h post-injection ou post-prélèvements et lors de chaque pesée. Nous n'avons jamais observé de mauvais état général ni d'anomalies du comportement dans nos différents protocoles d'immunisation. Cependant des points-limites ainsi que des critères d'arrêt précis ont été développés et seront utilisés afin de s'assurer du bien-être des animaux, entraînant leur mort anticipée si nécessaire.

Nous espérons que les résultats obtenus lors de ce projet nous permettront d'identifier des composés immunogènes dans le but de les tester par la suite dans des modèles animaux de maladies inflammatoires chroniques ou de cancers, ce qui pourrait entraîner, à terme, un élargissement de l'offre thérapeutique pour les patients.

15692 Les lésions de la cornée constituent un motif fréquent de consultations aux urgences ophtalmologiques. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, les opacités cornéennes représentent la quatrième cause majeure de cécité dans le monde. La cornée est le tissu transparent qui recouvre l'oeil au niveau de l'iris et de la pupille. Sa transparence est altérée lors de lésions chez des sujets sains ou malades. Peu de traitements efficaces existent pour améliorer la cicatrisation cornéenne.

L'objectif de ce projet est d'étudier les étapes de cicatrisation cornéenne suite à une lésion de la cornée chez la souris, et ainsi déterminer l'impact du microenvironnement (correspondant aux larmes et fibres nerveuses) sur ce processus. Ce modèle de cicatrisation aidera au développement de solutions thérapeutiques pour lutter contre les opacités cornéennes en contextes physiologiques et pathologiques. Pour cela, la cicatrisation cornéenne sera étudiée soit sur un seul oeil, soit sur les deux yeux chez des souris sauvages et transgéniques.

La règle des 3 R sera appliquée à ce projet

Remplacer Un système vivant est nécessaire à l'étude des étapes de cicatrisation cornéenne suite à une lésion de la cornée. Le modèle de cicatrisation cornéenne impose l'utilisation d'animaux pour la recherche en ophtalmologie.

Réduire Le projet impliquera l'utilisation de 3780 souris au maximum sur une période de 5 ans. Ce nombre d'animaux est basé sur nos travaux précédents dans la mise en place du modèle de cicatrisation cornéenne chez la souris.

Raffiner Les animaux seront hébergés dans un environnement conforme et enrichi (copeaux de bois, des bâtonnets de coton et des igloos). Le bien-être et l'état de santé des animaux seront quotidiennement surveillés tout au long du projet et évalués grâce à une grille de suivi (état général, comportement, lésions avancées). Les procédures expérimentales seront réalisées sous anesthésie couplée à une analgésie post-opératoire. Les expérimentateurs prodigueront les soins éventuels aux animaux et veilleront au respect des points limites.

Cette recherche innovante fournira des informations critiques sur les étapes de cicatrisation de la cornée, permettant à court ou moyen terme de proposer de nouvelles cibles thérapeutiques qui permettront d'aider les patients.

15693 Chez l'homme la stimulation de nerfs périphériques est utilisée pour le traitement de maladies du système nerveux central comme l'épilepsie ou la dépression. De nos jours, plus de 50000 patients dans le monde sont implantés avec des microstimulateurs.

On sait que la stimulation de certains nerfs périphériques agit également directement sur les cellules du système immunitaire en inhibant leur activité, ouvrant la voie au traitement des maladies autoimmunes par les techniques d'électrostimulation de nerfs périphériques chez l'humain (Chavan et al. Immunity, 2017, DOI : 10.1016/j.immuni.2017.06.008). Il a été montré chez la souris que l'électrostimulation des nerfs périphériques et plus particulièrement le nerf de la rate (nerf splénique) diminue l'inflammation et l'activité des cellules immunitaires. Ces études ont été à la base d'un essai clinique réalisé avec des patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde chez lesquels l'électrostimulation résulte en une amélioration significative des scores cliniques. L'électrostimulation de nerfs périphériques constitue donc une approche thérapeutique prometteuse pour le traitement chronique des maladies autoimmunes et notamment la sclérose en plaque. La sclérose en plaque multiple (MS) touche plus de 2.3 millions de personnes dans le monde avec des atteintes neurologiques invalidantes. Différentes formes cliniques existent selon la progression de l'aggravation des attaques de ces fonctions neurologiques. Il s'agit de pathologies autoimmunes inflammatoires conduisant à des attaques des constituants de Système Nerveux Central (CNS). La forme la plus courante est caractérisée par des poussées inflammatoires, espacées par des périodes de rémission. Les patients atteints de cette forme de MS ont une qualité de vie extrêmement altérée selon l'intensité et la fréquence des poussées et il n'existe pas à l'heure actuelle de traitements curatifs pour cette maladie. Une thérapie basée sur l'électrostimulation des nerfs périphériques est une approche thérapeutique innovante, présentant une toxicité potentielle moindre comparée aux molécules de type stéroïdien par exemple et pourrait apporter une nouvelle alternative thérapeutique pour les patients réfractaires aux traitements actuels. Le présent projet se propose ainsi d'étudier l'effet de l'électrostimulation nerveuse sur le développement de la MS.

Pour la MS, il existe un modèle *in vivo* largement utilisé, le modèle d'Encéphalite Autoimmune Expérimentale (EAE) induite chez la souris C57BL/6 par immunisation avec une protéine exprimée au niveau du CNS, la Myeline Oligodendrocyte Glycoprotéine (MOG). Dans ce modèle dit chronique, les souris développent des signes d'atteintes neurologiques similaires à celles observées chez les patients atteints de MS conduisant à une paralysie progressive des membres postérieurs puis antérieurs.

Notre démarche expérimentale consistera donc à électrostimuler le nerf de la rate chez des souris atteintes d'EAE. En tenant compte des mesures de réduction et de raffinement mises en place, les contraintes imposées aux animaux ont été évaluées et mises en balance avec les résultats escomptés et permettent d'envisager une balance dommage / avantage favorable à la réalisation de ce projet.

Remplacement Ce type d'étude ne peut être envisagés que sur des organismes entiers préservant l'intégrité des interactions entre les systèmes immunitaires et nerveux dans un contexte pathologique et non pathologique.

Réduction Le plan d'étude est conçu pour éviter une initiation non nécessaire des procédures en réalisant des tests statistiques pour chaque procédure. Ainsi, si les résultats obtenus lors de la procédure 1 ne sont pas validés, les procédures 2, 3 et 4 ne seront pas réalisées. Par conséquent, le nombre de souris indiqué est un nombre maximum.

Raffinement Des mesures de raffinements seront mises en place afin de limiter au maximum les contraintes imposées aux animaux dans le contexte de cette étude les interventions chirurgicales seront menées suivant un protocole d'anesthésie et d'analgésie en prenant soin de maintenir la température corporelle des animaux en les plaçant sur une couverture chauffante. Le suivi postopératoire inclura un traitement antalgique et une grille d'observation préétablie prévoyant des mesures correctives et la mise en œuvre le cas échéant de points limites précoces et adaptés.

L'ensemble du projet nécessitera au maximum l'utilisation de 270 souris.

15694 L'État de Stress Post-Traumatique (ESPT ou PTSD, pour Post-Traumatic Stress Disorder, APA 1994) est une pathologie psychiatrique qui touche 8 à 12% de la population générale.

Le PTSD se caractérise par une constellation de symptômes qui surviennent après l'expérience d'un événement traumatique pouvant être léthal, causer une blessure grave ou menacer l'intégrité

physique. Ce traumatisme va provoquer une réaction de peur intense, un sentiment d'impuissance ou d'horreur. La symptomatologie du PTSD se définit alors par un syndrome de reviviscence traumatique, un évitement et émoussement affectif et une activation neurovégétative.

L'efficacité des thérapies pharmacologiques (antidépresseurs) ou psycho-cognitive reste cependant relative et limitée. L'amélioration de l'arsenal thérapeutique dans le traitement du PTSD représente donc un enjeu de santé publique majeur. Ces dernières années, les techniques de neurostimulation sont en train d'émerger. Au laboratoire, nous avons mis au point le traitement par Stimulation Transcrânienne Ultrasonore répétée (rTUS) du cortex infralimbique dans le traitement de la dépression. C'est une technique qui offre l'avantage d'être non-invasive

L'objectif de cette étude sera de tester l'efficacité d'une stimulation rTUS du cortex infralimbique dans le traitement du PTSD.

Pour cette expérience, 124 souris réparties en 8 lots expérimentaux de 15 souris mâles et 4 souris servant à la validation des paramètres de stimulation rTUS sont requises.

En application de la règle des 3 R au modèle utilisé dans cette étude

Raffinement le stress traumatique appliqué aux animaux peut être qualifié de moyen, en raison de sa brièveté. Les conditions d'élevage des animaux seront optimales au regard des normes en vigueur. Tous les animaux seront hébergés ensemble, stressés et non stressés, avec enrichissement du milieu. Les expérimentateurs sont experts dans la préhension/contention des souris et sont soucieux d'éviter tout stress lors de la réalisation des procédures. Les injections quotidiennes d'antidépresseur ont été remplacées par un traitement dans l'eau de boisson.

Remplacement aucune méthode alternative *in vitro* n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée. Le PTSD chez l'animal, comme modèle de pathologie psychiatrique humaine, repose sur l'observation du comportement de l'animal vivant.

Réduction les effectifs sont optimisés, les observations comportementales nécessitent une taille d'effectifs suffisant compte tenu de la variabilité inter-individuelle (n=15 sujets par groupe). Les souris seront uniquement mâles, afin d'éviter les variations comportementales provoquées par le cycle menstruel de la femelle et ainsi réduire le nombre total d'animaux.

Suite à la crise du COVID19, 108 animaux sur les 124 animaux prévus pour l'expérimentation ont dû être euthanasiés. Seize animaux seulement avaient terminé complètement les tests mais dans un souci d'homogénéité des expériences il sera préférable de ne pas tenir compte de ces premiers animaux testés et de recommencer avec un nouveau lot de 124 souris Swiss.

Le nombre total d'animaux sera de 248 animaux au lieu de 124 prévus initialement.

15695 L'autisme et la schizophrénie sont des maladies neurodéveloppementales elles sont liées à des anomalies de formation du système nerveux. De cause encore inconnue, ces troubles mentaux sévères affectent plusieurs dizaines de millions de personnes dans le monde et ne bénéficient d'aucun traitement. Il est donc essentiel de mettre en évidence les premiers dérèglements responsables de la fragilisation du cerveau, dans le but de lutter au plus tôt contre la mise en place des symptômes dramatiques de ces pathologies.

L'objectif de ce projet de recherche fondamentale est de découvrir les bases neurobiologiques de ces maladies neurodéveloppementales. Un déséquilibre de production entre les cellules neuronales et gliales issues des cellules souches neurales pourrait être à l'origine de la formation d'un cerveau dysfonctionnel. Pour explorer cette hypothèse, nous employons une nouvelle stratégie d'ingénierie génétique et de visualisation des cellules le marquage multicolore MAGIC Markers. Pour produire ce marquage, nous utilisons des souris sauvages gestantes et des souris transgéniques MAGIC Markers. Dans les deux cas, le marquage coloré sera déclenché soit par administration de tamoxifène (Procédure 1), soit par électroporation (Procédure 2). Ce marquage coloré des cellules souches neurales à différents stades de développement permettra de suivre plusieurs cellules souches neurales à la fois ainsi que leur descendance respective (neurones, cellules gliales dont les astrocytes et les cellules satellites corticales), depuis le développement précoce jusqu'au cerveau mature. En parallèle des animaux transgéniques et sauvages, nous utiliserons également

des modèles génétiques murins de maladies neurodéveloppementales. Ces approches permettront d'étudier pour la première fois *in vivo* en contexte sain et pathologique I) les propriétés et la régulation des cellules souches neurales au cours de la formation du cerveau, II) la coopération entre les neurones et les cellules gliales pendant le développement cérébral, III) les propriétés, le rôle et les mécanismes de régulation des cellules satellites corticales. Cette étude nous permettra d'étudier le développement du cortex cérébral des mammifères en observant plusieurs mécanismes fondamentaux comme la prolifération, la migration et la différenciation des cellules souches neurales, d'en déterminer les bases cellulaires et moléculaires, conservées également chez les mammifères supérieurs. Couplés à l'étude des mécanismes de régulation des cellules souches neurales et de leur descendance neuronale et gliale, ces travaux permettront de mieux comprendre les dérèglements qui peuvent impacter le développement cérébral et déclencher des troubles neurodéveloppementaux tels que l'autisme et la schizophrénie.

Ce projet combine des approches histologiques, vidéo-microscopiques, transcriptomiques, d'imagerie photonique et des analyses comportementales non invasives, suivant des procédures chirurgicales (électroporation *in utero*) et d'injections (orales par gavage, intrapéritonéales et sous-cutanées). Il respecte la règle des 3Rs

- Remplacement L'expérimentation animale est indispensable dans ce travail car aucun modèle alternatif nous permet actuellement de reproduire intégralement toute la complexité du développement cérébral des mammifères.

- Réduction Un maximum de 968 souris générées par 902 femelles gestantes sera nécessaire sur une période de 5 ans. Cet effectif a été optimisé pour obtenir des résultats fiables atteignant nos objectifs scientifiques, en privilégiant l'électroporation *in utero* qui nécessite moins d'animaux que les croisements de souris transgéniques et/ou mutantes. De plus, la procédure d'électroporation *in utero* est maîtrisée par le porteur de projet limitant le nombre d'animaux engagés dans la mise au point expérimentale. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, nous collecterons un maximum de données histologiques à des stades identiques et au sein d'un même animal pour générer des résultats pour plusieurs de nos études simultanément. Dans la même optique de réduction, l'analyse comportementale sera longitudinale la même cohorte d'animaux sera utilisée pour effectuer une série de tests comportementaux non douloureux. Enfin, la grande majorité de nos lignées murines sont déjà cryopréservées ou en cours de cryopréservation : toute lignée non utilisée sera donc rapidement arrêtée.

- Raffinement Tout au long de nos expériences, l'absence de douleur et le bien-être des animaux sont au cœur de nos préoccupations. Toutes les souris sont observées quotidiennement par un personnel qualifié et la surveillance accrue après chaque procédure. Toutes les expériences sont menées par un personnel qualifié. La procédure d'électroporation *in utero* est réalisée sous couverture anesthésique et analgésique. Pour éviter toute souffrance, des points limites stricts ont été définis selon une grille de suivi utilisant des indicateurs comportementaux et physiques.

Cette recherche innovante fournira des informations critiques sur les toutes premières étapes physiopathologiques des troubles neurodéveloppementaux et permettra d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques dans le but d'établir un diagnostic précoce de la pathologie et le développement de traitements préventifs et curatifs qui manquent cruellement à ce jour.

15696 L'expérimentation a pour ambition i) d'étudier les habitudes alimentaires des hominidés de la vallée d'Omo en Ethiopie; ii) d'étudier les performances zootechniques des porcs avec une conduite alternative à la conduite conventionnelle, à travers le prisme d'expérimentations sur les porcs. Le porc présente un nombre important de similitudes anatomiques et physiologiques aux hominidés, ce qui permet de l'utiliser comme modèle utile pour les recherches sur l'évolution physiologique des hominidés. Avec à une expérimentation d'alimentation contrôlée unique sur 24 porcs âgés de 139 jours en début d'expérimentation, nous testerons l'effet d'un régime riche en fibres de canne à sucre sur 12 animaux par rapport à un régime standard (concentré industriel) sur les 12 autres animaux pendant 13 semaines, sur les tissus dentaires des porcs âgés de 139 j en début d'expérimentation. Nous mesurerons : - les consommations moyennes (mesure des quantités allouées et refusées), la croissance par des pesées hebdomadaires, et l'adiposité par des mesures non invasives

d'épaisseur de lard dorsale. Les animaux seront abattus en fin d'expérimentation afin de prélever les crânes et les mandibules et d'évaluer la qualité des carcasses. Les animaux seront élevés en condition classique d'élevage (de la naissance à 138 jours d'âge), puis durant l'expérimentation pour moitié en loge individuelle (n = 12 6 porcs par ration) et en plein air (n=12 6 porcs par ration). Pour pouvoir tester l'effet canne à sucre, seul, non biaisé par des ingestions d'autres fibres, il est impératif de loger les 12 animaux en loge individuelle durant l'expérimentation afin de pouvoir quantifier la quantité de canne à sucre mastiquée par rapport à l'aliment standard. Quoique qu'en loge individuelle, les animaux auront suffisamment d'espace pour se mouvoir, voir et communiquer avec leurs congénères. En plein air, sur une surface de 1000 m², les animaux auront accès à deux abris pour se reposer, dormir et se protéger du soleil et de la pluie, et un accès à l'eau à volonté. Les conditions en plein air permettront de tester l'effet "particules terrigènes" et l'effet de la conduite en plein air sur les performances zootechniques en comparant les porcs ayant consommé de la canne à sucre en bâtiment ou en extérieur. Pour le dosage des numérations sanguines et la biochimie du sang, pour chaque animal, 4 prises de sang seront réalisées à la veine jugulaire après contention de l'animal avant la semaine d'adaptation (20 semaines d'âge), en début d'expérimentation (21 semaines d'âge), 7 semaines après et en fin d'expérimentation (33 semaines d'âge). Les animaux sont logés et alimentés dans de bonnes conditions, évitant la souffrance, la douleur ou l'angoisse. En plein air, les animaux pourront exprimer leur comportement naturel de fouisseur-fouineur et ils seront protégés de la faim, de la soif et disposeront d'abris pour se protéger du soleil et de la pluie. En bâtiment, les animaux sont logés dans des loges individuelles de 1,7 x 1,5 m leur permettant de se mouvoir sans difficulté. Ils seront aussi protégés de la faim, de la soif et l'environnement sera enrichi (canne à sucre, coco sec, ballon). Par ailleurs, dans tous les cas de figure (plein air ou bâtiment), le personnel technique intervenant dans l'expérimentation est sensibilisé aux signes de douleur (signes physiologiques augmentation de la fréquence respiratoire température corporelle anormalement élevée les signes comportementaux apathie, décubitus prolongé, modification de vocalises les apparences expression faciale ou posture inhabituelle). Dans le cas de signes de douleurs, de souffrance et d'angoisse prolongé, l'animal est isolé et soigné. La règle des 3R a été prise en considération : - Remplacement : l'utilisation de l'animal est nécessaire pour documenter les effets d'un régime riche en fibres sur les tissus dentaires - Réduction : un calcul du nombre d'animaux nécessaires a été réalisé afin d'estimer au plus juste le nombre d'individus à inclure dans le projet. Le nombre et la fréquence des prises de sang a été réduit au minimum. Par ailleurs, des collectes de salive, non invasives et non stressantes (simple présentation d'un coton à mâchouiller) seront réalisés, afin de mettre au point des dosages hormonaux dans la salive (cortisol salivaire) qui remplaceront à terme les dosages sanguins- Raffinement : les conditions d'hébergement sont raffinées par le fait même d'utiliser la canne à sucre qui permet l'activité et le comportement exploratoire en loge individuelle. En plein air, les animaux pourront exprimer leur comportement naturel de fouineur-fouisseur.

15697 Le but de cette étude pilote est d'établir et de caractériser des modèles tumoraux oculaires (rétinoblastome et mélanome uvéal) et de tester l'effet de deux traitements la photothérapie dynamique et la radiothérapie.

Rappelons que pour le rétinoblastome, la plupart des enfants des pays industrialisés guérissent de leur cancer, une majorité d'entre eux se font retirer l'œil (énucléation) pour éradiquer leur cancer perdant ainsi toute acuité visuelle et subissant un traumatisme esthétique. Pour le mélanome uvéal, 50% des patients décèdent de cette pathologie.

Nous voulons donc établir de nouveaux modèles de ces tumeurs oculaires pour ensuite trouver de nouveaux traitements afin de pouvoir conserver au maximum les yeux des patients (éviter l'énucléation) et guérir leurs cancers.

Les greffes orthotopiques, c'est-à-dire directement dans l'œil du rat présentent l'avantage d'implanter les cellules dans leur environnement d'origine (œil) et donc d'être le plus proche possible de la pathologie humaine. Les rétinoblastomes (tumeurs de l'œil de l'enfant) et les mélanomes uvéaux (tumeurs de l'œil de l'adulte) du fait de leur localisation nécessitent des développements thérapeutiques et des protocoles de traitements particuliers. Les essais précliniques dans ce

domaine sont peu nombreux du fait des difficultés de greffer dans l'œil des cellules tumorales et du suivi de ces tumeurs chez les petits rongeurs.

La photothérapie dynamique, (utilisée déjà dans certains cancers de la peau) repose sur l'utilisation combinée d'une molécule photosensibilisante et d'une source lumineuse la molécule photosensibilisante se concentre sélectivement dans les tumeurs oculaires. L'illumination de la zone tumorale par un laser active alors la molécule photosensibilisante qui détruit de manière spécifique les cellules anormales. L'efficacité ainsi que la toxicité éventuelle au niveau de la peau de la photothérapie seront comparées à celles d'un traitement conventionnel (la radiothérapie).

Des essais préliminaires seront réalisés pour identifier la souche de rats la plus optimale pour la prise de greffe. La greffe de cellules tumorales dans les yeux des rats entraîne une croissance tumorale au niveau de l'œil, cette greffe peut parfois engendrer un décollement de rétine comme chez les patients. Les traitements auront pour objectifs de tuer les cellules tumorales.

Au total nous utiliserons 250 souris et 270 rats.

Pour caractériser la prise tumorale, déterminer la croissance tumorale, réaliser un suivi thérapeutique et évaluer l'efficacité de la photothérapie dynamique ainsi que celle de la radiothérapie, nous imageons le fond d'œil et la rétine par tomographie par cohérence optique (OCT, utilisée classiquement chez l'homme). L'imagerie se déroule toujours sur animal anesthésié. Ces techniques d'imagerie nous permettent d'homogénéiser les groupes constitués en s'assurant que chaque rat a bien une croissance tumorale et aussi de réaliser un suivi dans le temps du même individu quand cela est possible. Ces techniques permettent donc de diminuer le nombre d'animaux utilisés.

En accord avec les recommandations internationales dans le domaine de la cancérologie, les animaux sont suivis quotidiennement afin d'assurer leur bien-être et les expérimentations sont arrêtées avant la souffrance des animaux.

Enfin, ces modèles de tumeurs oculaires générés chez le rat avec des greffes dans l'œil permettent de mimer le cancer des patients. Ils sont donc très utiles pour tester de nouvelles molécules thérapeutiques ou de nouvelles techniques de radiothérapies avant d'éventuels essais cliniques chez les patients. Ces nouveaux traitements sont d'abord validés sur des lignées cellulaires (sans animaux). L'utilisation d'un modèle animal (organisme entier) est indispensable pour étudier l'efficacité et la toxicité dans l'œil des nouveaux traitements.

15698 Dans ce projet nous allons étudier l'efficacité d'une approche de thérapie génique pour la glycogénose de type III (GDS III) dans un nouveau modèle rat de la pathologie. GSD III est une maladie autosomale récessive (1/100000 nouveau-nés) caractérisée par une dégénérescence progressive du foie et des muscles qui inclut le cœur. GSDIII est due à l'absence de l'enzyme de débranchement du glycogène (GDE), enzyme clé dans la dégradation du glycogène. La maladie se présente en deux phases une phase juvénile et une phase adulte. Chez l'enfant, les signes de la maladie sont une hépatomégalie, une hypoglycémie, une hyperlipidémie et un retard de croissance. Sans un régime alimentaire approprié les conséquences sont fatales. Chez l'adulte, la maladie a un phénotype musculaire dégénératif marqué avec une atteinte cardiaque. Actuellement, il n'y a pas de traitement pour GSDIII mais un régime riche en glucides complexes et en protéines peut ralentir son évolution. Un modèle souris de la maladie existe. Il mime la maladie humaine avec une glycémie réduite et une atteinte musculaire. L'étude de la fonction cardiaque chez la souris n'a pas permis de mettre en évidence des atteintes. Des études précédentes ont démontré dans une autre pathologie musculaire métabolique que le modèle rat mime aussi le phénotype cardiaque retrouvé chez l'homme. Dans l'objectif de reproduire au mieux la pathologie humaine et de la soigner nous avons développé un modèle rat de la GSDIII. Le but de ce projet est de caractériser le modèle rat et de tester une approche de transfert de gène dans ce modèle pour évaluer l'efficacité thérapeutique de nos produits de thérapie génique.

La première partie du projet, qui a pour but de caractériser le modèle rat GSDIII, sera un suivi à long-terme des animaux en utilisant notamment des techniques d'échocardiographie réalisées sous anesthésie gazeuse afin d'éviter un stress aux animaux (raffinement) et des prélèvements sanguins.

L'échocardiographie nous permettra de voir le cœur en entier sans avoir besoin de le prélever pour faire de l'histologie. Et donc grâce à cela, nous pourrions suivre un même animal sur le long terme à des intervalles réguliers pour évaluer le poids du cœur sans avoir recours au sacrifice. Cette caractérisation servira aussi à l'identification de l'âge optimal de traitement permettant de réduire le nombre de groupe par la suite (réduction). A la fin de cette première procédure, les animaux seront euthanasiés.

Dans les expériences suivantes, tous nos virus médicaments seront préalablement testés *in vitro* et nous utiliserons seulement ceux ayant montré la meilleure efficacité. Dans le cas particulier des maladies génétiques, le principe de la thérapie génique repose sur l'utilisation de virus modifiés pour véhiculer le gène « médicament » jusqu'aux cellules à traiter. L'organisme est entraîné à lutter naturellement contre les virus et ce mécanisme de défense est à ce jour impossible à recréer en laboratoire. Le modèle animal est donc aujourd'hui incontournable pour vérifier le pouvoir thérapeutique de nos virus. Nous ne pouvons pas les remplacer.

Nous avons sélectionné 4 vecteurs thérapeutiques candidats. Il est indispensable de tester ces vecteurs dans un modèle qui reproduit la pathologie cardiaque pour évaluer leur efficacité sur ce phénotype qui est absent chez la souris. Ces études utiliseront le minimum d'animaux possible estimé en fonction d'une analyse statistique prédictive (test de comparaison des moyennes) afin d'obtenir les résultats les plus robustes en impliquant le moins d'animaux possible (Réduction). De plus, nous évaluerons le maximum de paramètres requis sur les mêmes animaux après leur mise à mort dans la même expérience pour limiter leur nombre.

Dans ces études, nous prévoyons d'utiliser 175 animaux. Les rats seront élevés et reproduits dans notre établissement utilisateur. Notre projet durera 5 ans.

15699 Afin de produire de la biomasse et de proliférer, dans la majorité des tumeurs solides, les cellules tumorales fonctionnent d'un point de vue énergétique en utilisant préférentiellement du glucose et en le transformant en pyruvate et ce en anaérobiose mais également en aérobie. Ce processus est appelé effet Warburg. Ainsi, parmi les stratégies pour ralentir la croissance tumorale, il a été proposé de réduire la consommation de sucre et/ou la production d'acide lactique par les cellules tumorales. A cette fin, il a été proposé d'utiliser deux types de régimes (i) des régimes riches en acide gras et pauvre en sucre, comme le régime cétogène (ce type de régime a donné des résultats encourageants dans les gliomes) ou (ii) stratégie ou régime à pH basique afin de neutraliser l'acide lactique.

Dans cette étude des souris injectées avec des cellules tumorales seront nourries avec un régime cétogène et nous évaluerons l'impact de ce régime sur la croissance tumorale et aussi sur les cellules immunitaires infiltrantes, en particulier les macrophages et les cellules myéloïdes. Les macrophages adaptent leur phénotype à leur environnement et en particulier à l'environnement métabolique. Ils peuvent ainsi être pro ou anti-tumoraux en fonction de l'environnement dans lequel ils se trouvent. Il est donc indispensable de connaître l'impact d'un régime cétogène sur le phénotype des macrophages et autres cellules myéloïdes associés aux tumeurs. De plus, nous avons montré *in vitro* que les cellules tumorales de carcinomes rénaux humains en présence de corps cétoniques (produits issus du foie lors d'un régime cétogène) subissent des modifications phénotypiques. Ces modifications permettent entre autres de révéler de nouvelles cibles pour les anticorps monoclonaux utilisés en immunothérapie.

Notre projet vise ainsi à vérifier *in vivo* l'impact de ces modifications alimentaires sur la croissance tumorale afin d'envisager de proposer ce régime à des patients en complément d'une immunothérapie ciblée sur les antigènes tumoraux révélés par ce régime. Ces régimes alimentaires constituent des traitements faciles à mettre en œuvre et dénués de toxicité pour améliorer les chances de guérison des malades.

Notre démarche expérimentale tient ainsi en compte la règle des 3R

Remplacement l'utilisation des animaux est indispensable avant de proposer un traitement facile à mettre en œuvre et dénué de toxicité pour améliorer la survie des patients en jouant sur le système

immunitaire. En effet, seul un modèle *in vivo* nous assure de l'implication de nos régimes alimentaires dans des conditions physiopathologiques proches de la réalité clinique.

Réduction les modèles seront réalisés sur un nombre nécessaire et suffisant d'animaux (350 souris). Ce nombre a été défini afin d'exploiter des résultats statistiquement fiables.

Raffinement les souris seront hébergées dans des conditions adaptées à l'espèce avec un enrichissement du milieu. Le protocole expérimental comprend un suivi quotidien des animaux, des indicateurs comportementaux et physiques prédéfinis (état général, prostration, poil hérissé, suivi pondéral de l'animal) seront évalués quotidiennement, et constitueront les points limites de l'expérience (mise à mort de l'animal). Pour éviter toute souffrance de l'animal au cours du protocole expérimental des analgésiques seront donnés. Ce projet s'inscrit ainsi dans une gestion éthique de l'expérimentation animale et est donc en accord avec les réglementations européennes et françaises de bonnes pratiques de laboratoire.

15700 Les anévrismes (AA) et dissections aortiques (DA) sont des pathologies fréquentes chez le sujet de plus de 65 ans et représentent une cause de morbi-mortalité importante. Les AA et DA se caractérisent par une atteinte de la paroi artérielle qui se traduit par une dégradation de la structure qui lie les cellules entre elles et une baisse de la contraction de cellules au sein de la paroi de l'artère.

Le plasminogène est un enzyme qui intervient dans la coagulation du sang mais peut aussi traverser la paroi des artères. Des publications antérieures ont montré le rôle central du plasminogène dans l'évolution des anévrismes aortiques.

Nous souhaitons comprendre les mécanismes d'action du plasminogène dans un modèle de dissection aortique chez le rat.

Dans un premier temps nous voulons valider un nouveau modèle de dissection aortique chez le rat. Ce modèle est obtenu à partir d'un traitement pharmacologique donné par voie orale bien décrit dans la littérature chez la souris. Ce traitement fragilise les artères et réalise une sensibilisation de l'artère. Ce modèle nécessite l'implantation chez le rat d'une micro-pompe sous cutanée afin de délivrer une dose continue d'une substance vasoactive pour induire la dissection aortique. Dans un deuxième temps nous allons étudier l'effet délétère du relâchement de la paroi de l'artère dans ce modèle (en testant différents vaso-dilatateurs) afin de confirmer l'effet délétère du relâchement en favorisant le passage du plasminogène dans la paroi. Ces molécules seront administrées par voie orale mélangées à l'eau de boisson ainsi qu'à la nourriture.

Enfin nous testerons l'effet protecteur de l'acide tranéxamique (un « anti » plasminogène) ayant pour but de diminuer l'agression de la paroi vasculaire dans les AA et DA.

Dans ce projet, la règle des 3R sera respectée. Au total ce projet nécessitera 120 rats sur une durée de 3 ans. Les chirurgies d'implantation des pompes (chirurgie courte et considérée comme peu douloureuse) seront faites sous anesthésie générale avec un traitement antidouleurs post opératoire. Les animaux seront surveillés quotidiennement. Les critères de traitement pour soulager l'animal et / ou les critères d'arrêt définis (clinique et par scoring) seront appliqués afin d'éviter toute souffrance. Nous raffinerons l'environnement des animaux par enrichissement de leur milieu de vie. Nous réduirons au maximum le nombre de rats utilisés, tout en assurant que les études réalisées nous permettent d'effectuer les analyses statistiques nécessaires. L'utilisation de techniques d'imagerie telles que l'échographie et l'IRM nous permettront d'obtenir un maximum d'information par rat. En fin de protocole, les animaux seront euthanasiés afin d'analyser les tissus aortiques La complexité de la pathologie aortique (associant des mécanismes physiopathologiques et hémodynamiques) est impossible à reproduire *in vitro* et rend obligatoire l'utilisation d'animaux.

15701 Notre laboratoire développe depuis de nombreuses années des modèles murins transgéniques permettant l'étude d'un groupe de pathologies, les maladies de dépôt d'immunoglobulines monoclonales, qui viennent gravement compliquer plusieurs maladies hématologiques tel que le myélome multiple. Le pronostic vital des patients est souvent très péjoratif du fait de ces complications. Ces maladies se caractérisent par le dépôt dans divers organes de tout ou partie

d'un anticorps (ou immunoglobuline) qui est produit en excès lors d'une prolifération plasmocytaire monoclonale.

Dans un premier volet, en lien les médecins en milieu hospitalier, nous souhaitons développer un nouveau modèle murin qui exprimera des immunoglobulines humanisées afin de comprendre les mécanismes physiopathologiques de formation des dépôts dans les maladies de dépôts d'immunoglobulines.

Dans un second volet, nous souhaitons utiliser notre modèle pour la production d'anticorps thérapeutiques ciblant les dépôts d'immunoglobulines. L'immunisation de nos animaux avec des extraits de dépôts d'immunoglobulines nous permettra de produire des anticorps dirigés contre ces dépôts. La production de ces anticorps serait une innovation importante pour la prise en charge de ces maladies car les seuls traitements actuellement disponibles ne visent que la cause des dépôts, et non les dépôts eux mêmes.

Cette lignée va être générée par transfection de cellules souches embryonnaires murines puis micro-injections des cellules modifiées dans des blastocystes de souris puis réimplantations dans des femelles pseudo-gestantes, selon la méthode de référence de transgénése. Nous allons évaluer dans un premier temps le niveau d'expression de notre gène d'intérêt sur des prélèvements sanguins, puis dans le cadre du premier volet de l'étude analyser la fonction des organes potentiellement ciblés par les dépôts d'immunoglobulines par divers dosages biochimiques sur des prélèvements sanguins et urinaires. Une fois ces procédures réalisées, les organes de ces souris seront prélevés sur les animaux euthanasiés afin de réaliser une analyse des lésions histologiques sur différents tissus, notamment le rein. Pour le second volet, nous allons analyser le développement lymphocytaire et isoler après immunisation les cellules produisant des anticorps spécifiques dirigés contre des dépôts.

Ce projet répond aux exigences des 3R

-Remplacement Les modèles cellulaires ne permettent pas de reproduire la complexité de la pathophysiologie des maladies de dépôts qui peut varier par le nombre et la localisation des atteintes d'organes, et ne permettent pas non plus de reproduire l'incidence d'une défaillance d'organe sur un autre organe ou l'organisme dans son entier. Des modèles murins pour certaines maladies de dépôts ont déjà été développé par le passé et ont permis d'atteindre les objectifs précédemment évoqués.

-Réduction Nous avons déjà développé ce type de modèle et bénéficions donc du recul et de l'expérience nécessaire pour limiter les besoins en animaux car de nombreuses expériences sont déjà au point. Nos procédures sont peu invasives, ce qui nous permet de réaliser un maximum d'expériences sur un minimum d'animaux. Ainsi ce projet ne requiert l'utilisation que de 346 animaux.

-Raffinement Les animaux sont élevés dans des conditions d'hébergement qui respectent leur bien-être (contrôle de la température et de l'hygrométrie de l'environnement, densité d'animaux, présence d'enrichissement, change régulier des litières, eau et nourriture à volonté, surveillance quotidienne des animaux). Toutes les procédures sont réalisées

de façon à limiter le stress et la souffrance des animaux (anesthésie au besoin, acclimatation progressive des animaux aux cages métaboliques).

15702 Environ 350 millions de personnes sont atteintes de dépression à l'échelle mondiale et près de la moitié n'ont pas accès à un traitement efficace (rapport OMS, 2012). Bien que de nombreux traitements existent, leurs efficacités reste moyenne, avec 70% des patients qui présenteront une amélioration des symptômes et seulement 30% une rémission totale. Par conséquent, le développement d'alternatives et l'amélioration de l'arsenal thérapeutique existant sont devenus des problématiques majeures pour les patients. De nombreuses études ont mis en évidence un lien entre l'action de nombreux traitements antidépresseurs classiques pharmacologiques mais aussi de thérapie de stimulation cérébrale et la neurogénése hippocampique adulte. En effet, il semble que ces nouveaux neurones soient nécessaires ou tout du moins impliqués dans certains effets antidépresseurs. Cependant, les mécanismes précis par lesquels la neurogénése hippocampique

serait impliquée dans les effets antidépresseurs restent peu connus. Ainsi, ce projet cherche à mieux comprendre le rôle de ces nouveaux neurones dans la vulnérabilité à développer un état dépressif afin de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques dans le traitement de cette pathologie.

Pour cela, nous allons étudier les effets d'une augmentation de la neurogénèse hippocampique dans un modèle murin de dépression, grâce à une souche de souris transgénique permettant d'induire une augmentation du nombre de nouveaux neurones à un moment donné.

L'objectif de cette étude sera alors 1) d'observer si cette stimulation de la neurogénèse permet de diminuer de façon durable les symptômes de la dépression et 2) comprendre quels mécanismes sous-tendent l'apparition des effets thérapeutiques via l'étude de l'activité neuronale de certaines régions d'intérêts dans la dépression.

Ce projet vise à développer une alternative thérapeutique aux patients pharmaco-résistants. Pour cette expérience, 96 souris réparties en 8 lots sont requises.

En application de la règle des 3 R au modèle utilisé dans l'étude

Raffinement le stress appliqué aux animaux peut être qualifié de moyen. Les conditions d'élevage des animaux non stressés seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement du milieu. Les expérimentateurs sont experts dans la préhension/contention des souris et sont soucieux d'éviter tout stress lors de la réalisation des procédures. Afin de prévenir l'éventuelle douleur lors de l'injection un anesthésique local en gel sera appliqué au niveau du site d'injection.

Remplacement aucune méthode alternative *in vitro* n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée. Le stress chronique chez l'animal, comme modèle de pathologie psychiatrique humaine, repose sur l'observation du comportement de l'animal vivant. Aucun marqueur cellulaire *in vitro* n'est disponible. De plus, les dosages biologiques requièrent des prélèvements frais qui ne peuvent être réalisés que sur animaux sacrifiés avec délai post-mortem et conditions de prélèvement contrôlés.

Réduction les effectifs sont optimisés, les observations comportementales nécessitent une taille d'effectifs suffisant compte tenu de la variabilité inter-individuelle (n=12 sujets par groupe). Les souris seront uniquement mâles, afin d'éviter les variations comportementales provoquées par le cycle menstruel de la femelle et ainsi réduire le nombre total d'animaux. De plus, la rationalisation des procédures permet d'optimiser l'utilisation des échantillons cérébraux prélevés.

Suite à la crise du COVID19, 64 animaux ont dû être euthanasiés alors qu'ils avaient commencé l'expérimentation, 32 animaux seulement avaient terminé complètement les tests. Le nombre total d'animaux sera de 160 animaux au lieu de 96 prévus initialement

15703 Les maladies inflammatoires/infectieuses ou les traumatismes peuvent entraîner d'importants défauts osseux craniofaciaux, aux conséquences esthétiques et fonctionnelles, rendant la réadaptation des patients compliquée. Le traitement de ces lésions est compliqué. Les substituts osseux de synthèse ou biologiques utilisés actuellement ne permettent souvent pas une réparation osseuse totale du tissu.

L'objectif principal de ce projet est de pouvoir recréer un os fonctionnel, c'est-à-dire un tissu ayant la capacité de se minéraliser et se solidifier. Aussi la première étape de ce projet sera de promouvoir la formation des vaisseaux sanguins en étudiant l'impact d'une formation *in vitro* des vaisseaux sanguins de façon précoce dans des matrices composées de biomatériaux et de cellules implantées dans ces matrices. En effet, si ce genre de matrices composées de cellules sont déjà utilisées dans des méthodes de régénération tissulaire de l'os, l'intérêt de promouvoir la formation de vaisseaux avant implantation dans des défauts cranio-faciaux, n'a encore été que peu investigué chez l'animal. Dans ce but, des cellules souches (capable de se différencier en n'importe quel type de cellule) d'origine dentaire seront mis en culture avec (ou sans) pré-traitement pour promouvoir la survie des cellules. Ces cellules souches seront combinées avec des cellules spécifiques et caractéristiques des vaisseaux sanguins. Puis ces amas cellulaires seront combinés avec une structure rigide composée de collagène et implantées dans une tranche de dent ou au sein d'un matériau inerte masi compatible avec une implantation chez la souris. Enfin ces structures seront implantées chez des souris pour permettre le développement et la survie de ce nouveau tissu. Des données

de la littérature ont montré l'intérêt d'associer ces deux types cellulaires pour créer un réseau vasculaire mature implantable et assurer la viabilité de l'ensemble du nouveau tissu. Le modèle de la tranche de dent est un modèle classique bien décrit dans la littérature et maîtrisé sur des souris immunodéprimées pour permettre l'implantation de cellules humaines. Il permettra une analyse précise de la formation de nouveaux vaisseaux fonctionnels par des techniques d'imagerie différentes comme la tomographie par émission de positons (TEP), par imagerie à ultrasons et l'imagerie 3D à rayons X à très haute résolution à des temps plus tardifs. Ces différentes modalités d'imagerie seront réalisées à plusieurs temps, l'imagerie TEP à 10 jours après implantation de la matrice chez l'animal et l'imagerie à ultrasons et à rayons X à 3 et 4 semaines. Ce projet dans sa globalité va s'intéresser à suivre l'évolution du réseau vasculaire implanté sur 4 semaines.

La règle des 3R sera respecté au cours de ce projet de 5 ans. A l'heure actuelle, il n'existe pas d'équivalent *in vitro* pour ce genre de projet, l'utilisation d'animaux reste donc indispensable pour ce type de projet. Elle nécessitera 60 animaux (nombre minimum pour permettre une étude statistique) répartis en 3 groupes afin de conclure sur l'intérêt de d'initier la formation des vaisseaux sanguins dans les matrices avant implantation. Ces 3 groupes vont différer de par la méthode de culture des cellules utilisée avant l'implantation de la matrice chez l'animal, 3 milieux de culture seront étudiés (n=20 par groupe). Cette structure des groupes a été validée par comparaison avec des études déjà publiées. Des points-limites ont été établis et une grille d'évaluation de la douleur a été développée spécifiquement pour cette étude. Un score de douleur trop élevé, même après médication, impliquera l'euthanasie de l'animal avant la fin de l'étude. Cette demande fait partie d'une collaboration et ne concerne que la partie d'imagerie par tomographie à émission de positons, la mise en place de du modèle animal sera effectué dans un autre site de recherche. Le transport des animaux entre le lieu de la mise en place du modèle et le lieu où sera réalisé l'imagerie sera assuré par un transporteur agréé ou via le véhicule dédié du site duquel partent les animaux.

15704 Le cervelet est une structure cérébrale clef dans le contrôle de la fonction motrice ainsi que dans les fonctions cognitives. Une dérégulation de l'activité du cervelet est ainsi retrouvée à la fois dans des pathologies avec des troubles moteurs et des pathologies avec des troubles comportementaux et émotionnels. Au niveau de cervelet, plusieurs types de transmission entre les neurones (les cellules composant le tissu cérébral) sont possible. Parmi ces types de transmission, nous nous intéressons ici à la transmission dite « cholinergique » c'est-à-dire utilisant la molécule de l'acétylcholine comme moyen de communication entre neurones. Une perturbation de la transmission cholinergique au niveau du cervelet pourrait expliquer certains dysfonctionnements du cervelet, à la fois d'un point de vue moteur et émotionnel. Cependant, le rôle de la transmission cholinergique dans le cervelet est à ce jour mal connue.

Dans ce projet, nous caractériserons cette transmission spécifique dans le cervelet afin de comprendre le rôle de l'acétylcholine et sa possible dérégulation dans les pathologies associées.

La réalisation de ce projet nécessite l'utilisation de différentes lignées de souris transgéniques permettant 1) l'identification des neurones du cervelet synthétisant l'acétylcholine et de 2) déterminer le rôle de ces neurones dans le cervelet, à la fois au niveau physiologique et au niveau comportemental.

Le nombre total d'animaux prévu pour cette étude est de 432 sur une période de 3 ans. Ce nombre a été déterminé de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en en gardant suffisamment pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées. En plus, ce chiffre comprend le nombre d'animaux utilisés pour des études préliminaires (pilotes), afin de mettre en place de nouvelles techniques, ce qui permettra de diminuer la quantité d'animaux utilisés à long terme. Des femelles et des mâles seront utilisées, ainsi que tous les animaux d'une même portée (transgénique positifs et négatifs) afin de limiter le nombre d'animaux générés sans être utilisés pour l'expérimentation.

Le projet traitant de troubles neuropsychiatriques et nécessitant des approches comportementales, il nous est impossible de remplacer l'animal vivant par des méthodes alternatives. Enfin, en vue du raffinement des procédures, un soin particulier est apporté aux questions relatives au bien-être animal. Ce projet implique de la neurochirurgie qui sera effectuée sous anesthésie générale avec

une prise en charge antalgique adéquate. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à une grille codifiant le niveau de bien-être. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée si des signes de souffrance sont détectés. Ainsi, les souris sont hébergées en cages collectives présentant un environnement enrichi, dans une pièce dédiée, avec régulation de la température, de l'humidité et de la luminosité. Avant les expériences, les animaux sont manipulés fréquemment afin de les habituer aux expérimentateurs et réduire ainsi leur stress.

15705 Le cancer reste parmi les premières causes de décès dans le monde. L'évaluation des nouvelles thérapies disponibles aujourd'hui nécessite le développement des modèles pertinents, représentatifs de la tumeur humaine. Les xénogreffes obtenues à partir de l'implantation des tumeurs humaines sur souris sont actuellement parmi les modèles les plus proches des tumeurs des patients et permettent la réalisation d'études pharmacologiques dont le potentiel prédictif clinique est très élevé. Ainsi elles constituent un outil primordial pour tester l'efficacité de nouveaux médicaments ou encore de nouvelles combinaisons ou schémas d'administration de médicaments. Ces essais précliniques peuvent avoir différents objectifs déterminer le type tumoral qui présentera le plus de bénéfice au traitement, déterminer les combinaisons et les fréquences d'administration qui seront les plus efficaces mais également effectuer des études moléculaires de la tumeur qui permettront d'explicitier le mécanisme d'action des molécules testées ou encore les mécanismes de résistance de ces tumeurs par rapport à ces thérapeutiques. Ces essais précliniques sont des phases préliminaires aux phases cliniques. Ils permettent d'orienter les développements futurs des nouvelles molécules et d'optimiser des traitements qui seront ensuite utilisés chez l'homme

Les modèles de xénogreffes de notre laboratoire se répartissent en plusieurs types tumoraux (sein, côlon, poumons, ovaire,). Ces tumeurs représentent la diversité de la maladie chez l'homme et sont mises à la disposition des partenaires avec lesquels nous collaborons pour évaluer des nouvelles drogues.

L'évaluation de l'effet de ces molécules comprend l'étude de la tolérance qui permet de déterminer la dose des molécules ou des associations de molécules sur de petits groupes d'animaux jusqu'à l'étude de l'efficacité anticancéreuse de ces mêmes molécules.

Nous basant sur notre activité de plateforme, nous pouvons envisager l'utilisation de 19005 souris en 5 ans, ceci correspondant à l'évaluation d'environ 30 molécules seules ou combinées entre elles sur 80 modèles. Ce nombre est réduit au minimum tout en assurant une puissance statistique significative des résultats obtenus. Ces animaux seront utilisés dans le respect des règles de raffinement exigées et les différentes procédures seront mises en œuvre de façon à engendrer le minimum de contraintes et de douleur (utilisation d'anesthésique, et d'analgésique et arrêt de l'expérience en respect des points limites définis préalablement tels que la taille des tumeurs, la perte de poids...)

L'utilisation d'animaux vient ici en complément à des études *in vitro* sur cultures de cellules tumorales réalisées au préalable, et permet la compréhension de l'effet de nouvelles molécules ou les associations de molécules sur un système intégré. Cela ne peut, pour le moment, pas être remplacé par des études autres que sur l'animal.

15706 Les reins assurent l'élimination des déchets de l'organisme en assurant la filtration du sang. Ils peuvent être affectés par de nombreuses maladies très différentes mais qui entraînent généralement une perte de filtration rénale, conduisant à l'apparition de protéines dans les urines (protéinurie) normalement absentes en cas de bon fonctionnement de l'organe. Dans les cas extrêmes, cette protéinurie peut aggraver les lésions rénales et aboutir à la destruction de l'ensemble du rein.

Les mécanismes d'apparition de la protéinurie sont nombreux et encore imparfaitement connus. Une protéine a été identifiée, la vasorine, dont l'absence entrainerait une protéinurie massive et des lésions rénales. Afin de mieux comprendre le rôle de cette protéine dans le fonctionnement du rein, nous utiliserons différentes lignées de souris mutantes.

Un premier modèle dans lequel on empêchera l'expression de la vasorine par injection de tamoxifène sera élaboré, afin de visualiser l'impact d'un manque de vasorine sur l'organisme. A partir de ce modèle d'étude, la relation entre l'effet de la vasorine et la voie du TGF β (rare ligand décrit de la vasorine, capable de l'inhiber) sera étudiée. Les souris adultes seront sacrifiées à différents temps après délétion de la vasorine. L'urine des animaux sera collectée une fois par semaine afin d'évaluer la fonction rénale de manière non invasive. De même, leur tension sera prise de façon hebdomadaire, et le sang sera prélevé lors du sacrifice des animaux ce qui permettra de doser plusieurs paramètres biologiques reflétant également la fonction rénale.

Un second modèle sera étudié, dans lequel la vasorine ne sera absente que dans certaines cellules rénales appelées podocytes, qui sont des éléments clés de la filtration du sang. Ces souris seront sacrifiées à différents âges après naissance, allant de 4 jours à 22 jours, pour établir une chronologie des lésions attendues. Des variants de cette lignée, n'ayant ni la vasorine ni le TGF β 1, seront également étudiés pour voir s'il y a une corrélation entre la voie du TGF β 1 et la vasorine dans le phénotype rénal.

Cette lignée de souris servira également à apprécier le rôle de la vasorine dans des modèles de néphropathies. Les souris hétérozygotes, n'étant pas totalement dépourvues de vasorine, seront ainsi intégrées à plusieurs protocoles d'induction de pathologies. Elles seront rendues hypertendues, malades au niveau des reins de manière chronique par administration d'un produit chimique, ou recevront par injection un sérum détruisant les reins pour mimer les pathologies humaines.

L'urine et la pression artérielle de ces souris seront prises régulièrement, jusqu'au sacrifice des animaux, lors duquel le sang sera prélevé. Les actes chirurgicaux nécessaires à l'implantation d'une mini-pompe osmotique pour établir le modèle d'hypertension seront réalisés sous anesthésie générale.

Enfin, des souris rapportrices dont le profil d'expression de la vasorine sera visible par fluorescence seront aussi utilisées dans les modèles de néphropathie suscités afin d'y visualiser les éventuelles variations d'expression de la vasorine, car nous ne disposons pas d'anticorps fiable permettant sa détection. La fonction rénale de ces souris sera évaluée de la même façon.

L'insuffisance rénale est une maladie complexe et seule l'expérimentation animale, résumant l'ensemble des interactions cellulaires au sein du rein, dans un organisme vivant, permettra d'étudier les mécanismes impliqués dans la protéinurie et la destruction rénale. La souris est un modèle de choix car son architecture et sa physiologie rénale sont proches de celles de l'homme. Nous tirerons parti de la transgénèse, c'est à dire le fait de pouvoir modifier les gènes des souris, pour confirmer l'importance de la vasorine dans l'organisme. Les cibles identifiées grâce aux modèles murins seront étudiées dans des cultures cellulaires en parallèle afin d'affiner nos résultats et de limiter le nombre d'animaux utilisés.

Ce projet s'inscrit sur une durée de 5 ans et un nombre maximal de 810 souris sera utilisé dans ce projet. Afin de prévenir toutes formes de souffrance et d'angoisse, ce projet sera mené dans le respect des 3R avec la mise en place d'une surveillance régulière, d'antalgiques et des points limites conduisant à la mort anticipée de l'animale si nécessaire. L'environnement des animaux sera enrichi par du coton de nidation, des bâtonnets à ronger. A terme, les résultats de ce projet permettront de comprendre plus précisément le rôle de la vasorine dans le fonctionnement rénal. Ils pourraient permettre l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques et aboutir à une meilleure prise en charge des patients atteints de maladies du rein.

15707 Le virus de la rage envahit le cerveau des mammifères qu'il infecte en se propageant, depuis un site d'inoculation, de façon rétrograde (c'est-à-dire en sens inverse des influx nerveux) et transneuronal (c'est-à-dire en passant à travers les connexions synaptiques) selon un processus dépendant du temps. Ces propriétés sont exploitées en neuroanatomie pour utiliser le virus de la rage comme traceur de réseaux de neurones afin de révéler et de cartographier leur architecture. Par ailleurs, le génome du virus de la rage peut être édité pour en altérer ses propriétés de transport

dans le système nerveux et/ou pour le transformer en vecteur de gènes d'intérêt vers des populations de neurones cibles.

Les expériences de ce projet ont pour finalité d'affiner, d'optimiser, et de développer l'utilisation du virus de la rage à des fins de neuroanatomie fonctionnelle. Ces expériences ont plusieurs objectifs comme 1) caractériser de façon systématique les propriétés de transport de différents lots de virus de la rage, 2) obtenir du tissu infecté pour développer les méthodes d'analyse, comme visualiser des neurones infectés sur des cerveaux entiers rendus transparent pour améliorer leur cartographie, 3) mettre au point une approche de double marquage transneuronal (c'est-à-dire l'utilisation simultanée de 2 souches de virus de la rage qui peuvent être différenciées l'une de l'autre), 4) tester de nouveaux outils viraux, en particulier des combinaisons de nouvelles souches modifiées de virus de la rage avec des vecteurs adjuvants et/ou d'autres traceurs neuroanatomiques.

Les expériences de ce projet reposent sur des variations de mêmes approches expérimentales. Celles-ci consistent en l'injection, par approche chirurgicale sous anesthésie et analgésie, d'une petite quantité de virus de la rage (souche modifiée ou non), en un ou plusieurs points d'entrée directement dans le système nerveux (cerveau, tronc cérébral, moelle épinière, ou nerfs) ou en périphérie (muscle, organe), du système nerveux, en conjonction ou non avec d'autres substances (virus et/ou vecteurs adjuvants et/ou traceurs neuroanatomiques conventionnels). Ces injections nécessitent généralement 1 procédure chirurgicale, mais occasionnellement 2 espacées de 4-12 semaines. Ces expériences seront réalisées essentiellement chez le rat et en partie chez la souris. La durée du temps de survie est adaptée en fonction de la ou des substances injectées pour permettre leur transfert dans les populations de neurones ciblées. En fin d'expérience, la distribution des neurones infectés est examinée par des approches immuno-histochimiques.

Les substances injectées aux animaux incluent des souches complètes de virus de la rage, des souches modifiées de virus de la rage, des vecteurs adjuvants (virus adéno-associés – AAV, ou adénovirus canin – CAV), et/ou des traceurs neuroanatomiques classiques (comme la sous-unité beta de la toxine du choléra). Parmi ces substances, les souches complètes du virus de la rage sont les plus à même de causer des complications pour le bien-être des animaux. En effet, le virus de la rage est un virus répliatif qui entraîne des dysfonctionnements dans les neurones qu'il infecte au terme de la maladie. Cependant, aux temps de survie utiles dans nos expériences, aucun symptôme neurologique lié à l'infection rabique n'apparaît. Ainsi, les procédures décrites dans ce projet ne sont pas considérées comme sévères.

REMPACER : Les méthodes non invasives de cartographie des réseaux nerveux (par exemple l'imagerie par résonance magnétique et diffusion de tension) ne permettent pas de décrire les réseaux avec une résolution cellulaire et moléculaire. Cette résolution n'est obtenue qu'avec des techniques invasives, comme celles utilisées ici, non utilisables chez l'Homme et nécessitant des organismes vivants entiers. De plus, ces expériences nécessitent l'utilisation de mammifères car le virus de la rage, qui est central pour ces outils, n'infecte que les mammifères. Les rongeurs sont adaptés pour les mises au point techniques qui sont décrites dans ce projet et sont en cohérence avec celles similaires réalisées dans d'autres laboratoires.

REDUIRE : Nous estimons notre besoin maximal en animaux pour ce projet à 120 rats et 45 souris (sur 5 ans). Nous utiliserons deux animaux par test, mais éventuellement un troisième pour trancher entre des résultats qui seraient ambigus. Nous envisageons 40 tests chez le rat et 15 chez la souris. D'une manière générale, les expériences de ce projet ont un objectif d'optimisation des outils de traçage avec le virus de la rage, ce qui a pour conséquence directe de limiter le nombre d'animaux utilisés dans l'ensemble des projets qui les utiliseraient. Par exemple, la caractérisation des propriétés de transport de chaque lot de virus permet d'ajuster plus précisément les temps de transport utiles à chaque projet. La mise au point du double marquage transneuronal permettrait de répondre à deux questions scientifiques chez le même animal et donc de diviser par deux le nombre d'animaux utilisés. Finalement, les tests de souche modifiée de virus, de combinaisons de traceurs et de nouvelles cibles à injecter en amont de la réalisation de projet permet de ne démarrer que des projets qui ont de grandes chances d'aboutir.

RAFFINER : Les prémédication, anesthésie, analgésie, suivi et soins post-opératoires se feront systématiquement selon des procédures validées par le vétérinaire. Pour les chirurgies, nous utiliserons une anesthésie locale aux points d'ouverture de la peau en plus d'une anesthésie générale. A la suite d'une injection de virus de la rage, l'animal sera placé en isolement dans un espace de confinement adapté pour une durée relativement courte (<7 jours) jusqu'à la fin de l'expérience. Pendant cette période, les animaux recevront un enrichissement renforcé (visites au moins toutes les 8-12h, variété des objets d'exploration) pour atténuer le stress de l'isolement. Il est important de noter que ces temps de survie sont typiquement trop courts pour l'apparition de symptômes liés aux injections de rage.

15708 Les leishmanioses sont des maladies parasitaires. La leishmaniose à *Leishmania infantum* est une infection naturellement transmissible de l'animal à l'Homme et vice-versa par la piqûre d'un petit moucheron se nourrissant de sang. 370 millions de personnes sont exposées aux risques et on estime qu'il y a environ 2 millions de nouveaux cas par an. Les leishmanioses représentent la deuxième cause de mortalité des maladies tropicales. Les traitements disponibles sont peu nombreux, difficilement accessibles aux pays en voie de développement, car très coûteux. Aujourd'hui, seulement deux vaccins pour les chiens ont reçu une autorisation de mise sur le marché pour l'Europe, mais aucun vaccin humain n'est commercialisé. De plus, les quelques traitements qui existent, posent des problèmes de toxicité élevée et de nombreuses résistances aux traitements sont rapportées. Afin de pouvoir étudier l'effet de nouveaux traitements, il est indispensable d'avoir les bons outils pour suivre *in vivo* l'évolution de l'infection, et cela, en utilisant le moins d'animaux possible. Pour cela, de nouvelles leishmanies bioluminescentes et fluorescentes ont été créées. Dans ce projet, nous souhaitons valider ces nouvelles souches de leishmanies et vérifier d'une part qu'elles possèdent toujours la capacité d'infecter une souris et d'autre part que nous sommes bien capables de suivre l'infection au cours du temps afin d'évaluer l'effet d'un traitement conventionnel. Dans ce projet, nous respecterons la règle des 3Rs. Réduction : L'utilisation de souches bioluminescentes et fluorescentes permet un suivi de l'infection sans avoir à sacrifier les animaux durant l'étude, ce qui réduit le nombre de souris utilisées dans l'étude. Remplacement : Les souches mutantes gardent les mêmes propriétés d'infection que la souche d'origine dans des cellules *in vitro*. Il nous est donc indispensable de passer au modèle souris qui sera utilisé dans l'ensemble de nos tests de nouvelles molécules anti-leishmanie. Raffinement : Les souris seront anesthésiées par gaz durant les étapes d'imagerie afin de leur éviter tout stress inutile. L'infection par des leishmanies n'implique aucune douleur à l'animal en dehors de l'injection et aucun symptôme de la maladie n'apparaît chez la souris. Néanmoins, nous suivrons l'apparition de douleur grâce à une grille d'observation. Pour ce projet, nous souhaitons utiliser 185 souris au maximum.

15709 La maladie de Huntington est une maladie génétique rare et létale qui provoque une dégénérescence des cellules à l'origine de troubles moteurs, cognitifs et psychiatriques évoluant toujours jusqu'à la mort du patient. Elle concerne environ 10 000 personnes en France. Elle se développe chez l'adulte et il n'existe aucun traitement qui permette de ralentir sa progression. Le projet présenté ici a pour but de déterminer le potentiel thérapeutique d'une molécule développée par une entreprise de biotechnologie. Cette étude fait suite à des essais positifs *in vitro*.

Pour ce faire, nous utiliserons des souris chez lesquelles nous induisons l'expression de la protéine huntingtine mutée dans le cerveau ce qui entraîne une pathologie rapide et localisée dans la région la plus vulnérable. Le recours à l'animal reste indispensable pour notre projet car aucun système en culture ou synthétique ne permet aujourd'hui de reproduire la complexité architecturale des cellules du cerveau. En particulier, ces systèmes ne permettent pas d'analyser le potentiel bénéfique thérapeutique d'un traitement chronique.

Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet proviennent d'élevages agréés. Leur nombre (70) a été réduit au minimum nécessaire pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées pendant l'année de l'étude. Ce projet nécessite l'injection intracérébrale de vecteurs viraux permettant l'expression de la huntingtine normale ou mutée par stéréotaxie et sera réalisée sous

anesthésie générale avec une prise en charge de la douleur péri et post-opératoire conforme aux protocoles analgésiques définis et validés par une équipe vétérinaire. Les animaux seront ensuite traités quotidiennement avec la molécule d'intérêt durant 6 semaines. A l'issue de cette période, une analyse histologique sera réalisée afin de déterminer le potentiel protecteur de la molécule sur la survie cellulaire.

L'application de critères d'arrêts en cas d'effets inattendus et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe permettent de garantir le bien-être des animaux. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

15710 La tomographie par émission de positons (TEP) est une technique d'imagerie médicale non invasive et très sensible qui repose sur l'utilisation de molécules radioactives (radiotraceurs) et qui contribue au diagnostic et/ou suivi de nombreuses pathologies cancéreuses. Cependant, pour permettre la détection précoce de ces pathologies cancéreuses, ces radiotraceurs doivent avoir une grande sélectivité tumorale. Des radiotraceurs de nouvelle génération ont donc été développés par assemblage moléculaire d'un isotope radioactif (dans notre cas le Fluor-18 ou le Gallium-68) et d'une entité vectrice comme des peptides, spécifiques de récepteurs surexprimés par les cellules cancéreuses.

Le but de ce projet est de déterminer le potentiel de nouveaux radiotraceurs développés en collaboration avec des radiochimistes sur des modèles de tumeurs cérébrales humaines.

L'imagerie TEP sera réalisée sur des souris femelles immunodéficientes (nude) porteuses de tumeurs humaines (cellules U87-MG) implantées sous la peau (6 souris par an au maximum soit 30 souris au total pour la durée du projet) et sur des rats mâles immunodéficients transplantés avec les mêmes cellules au niveau cérébral (3 rats par an au maximum soit 15 rats au total pour la durée du projet). Ces modèles sont largement utilisés pour valider les molécules d'imagerie TEP en cancérologie. Ces deux modèles animaux permettent d'obtenir des informations en termes de biodistribution corps entier (souris) et de sélectivité tumorale intracérébrale (rats) avec une résolution spatiale suffisante.

Le remplacement des expérimentations animales par des méthodes alternatives n'est pas possible puisque l'utilité même d'un radiotraceur est de permettre un suivi « *in vivo* ». L'imagerie TEP étant associée à la compréhension de processus d'ordres métaboliques et fonctionnels à l'échelle organique, il est nécessaire d'évaluer le potentiel des radiotraceurs synthétisés sur organisme afin de pouvoir estimer leur biodistribution sur un corps entier.

Le potentiel diagnostique de ces nouveaux radiotraceurs sera évalué par rapport à une molécule de référence qui est le 18F-FDG (glucose radioactif) sur les mêmes animaux en effectuant un double examen, qui a pour avantage que chaque animal constitue son propre témoin et qui diminuera le nombre d'animaux (Réduction). Cette technique d'imagerie TEP est réalisée sur des animaux anesthésiés n'entraînant aucune souffrance à l'animal (Raffinement).

15711 Les troubles envahissants du développement, dont les troubles du spectre autistique (TSA) sont une maladie neurodéveloppementale dont la prévalence ne cesse d'augmenter et dont on ne connaît pas encore suffisamment la physiopathologie pour développer des stratégies thérapeutiques. L'objectif du projet est d'utiliser un modèle animal environnemental de l'autisme (souris C57/Bl6 traité au poly I : C) afin de caractériser le dimorphisme sexuel et évaluer les facteurs neuroprotecteurs au niveau anatomique, cellulaire et moléculaire dans les régions cérébrales impliquées afin d'identifier les mécanismes et les réseaux neuronaux responsables de ces symptômes.

Ce projet pourrait permettre de mieux comprendre l'étiologie de cette pathologie psychiatrique neurodéveloppementale qui est à ce jour encore très mal connue. Un nombre croissant de preuves associe les TSA à un dimorphisme sexuel, les symptômes seraient différents selon le sexe et les femmes sembleraient neuroprotégées. Ainsi, cette caractérisation pourrait également ouvrir une

nouvelle voie dans le diagnostic quantitatif de ces troubles et suggérer des nouveaux moyens thérapeutiques personnalisés.

Les modèles animaux de souris dans ces pathologies se sont révélés d'une grande utilité car ils permettent l'analyse des réseaux neuronaux et la détermination des messagers chimiques qui sous-tendent les maladies cérébrales. La souris, et plus spécifiquement la souche C57/Bl6, est très utilisée comme modèle animal de troubles neurologiques et psychiatriques. De plus, l'utilisation de cette espèce ouvre la porte à l'utilisation de souris transgéniques portant des mutations spécifiques en phase avec notre projet de recherche sur l'autisme. Les rongeurs sont à ce jour les espèces modèles de petite taille ayant un système nerveux proche de l'Homme.

Une attention particulière est portée afin d'être en conformité aux 3R.

Remplacer Ces approches nécessitent la présence du réseau neuronal qui est uniquement accessible dans des modèles d'animaux intègres et donc vivants. Il n'est donc pas envisageable d'utiliser des méthodes de substitution à l'animal entier.

Réduire nous utilisons des tests statistiques de puissance afin de réduire au maximum le nombre d'animaux tout en nous permettant d'obtenir des résultats statistiquement exploitables.

Raffiner (i) nous avons planifié nos expériences en gardant à l'esprit la nécessité de réduire sinon de soulager l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'angoisse, et (ii) le bien-être des animaux sera pris en compte à chaque étape du projet par une surveillance quotidienne des animaux et l'apport d'enrichissement (éléments de nidification).

Pour la réalisation de ce projet, nous avons besoin de 250 souris.

15712 Le cancer, maladie caractérisée par une prolifération massive de cellules devenues anormales, est aujourd'hui un fléau mondial. De nos jours, il existe plus de 200 traitements en essais cliniques de phase III afin de lutter contre cette maladie, soulignant ainsi le potentiel extrêmement prometteur de l'exploration et l'exploitation du système immunitaire. Selon le dernier rapport de l'OMS, le fardeau mondial du cancer est aujourd'hui estimé à 18,1 millions de nouveaux cas et 9,6 millions de décès recensés en 2018.

Afin de traiter les personnes atteintes de cancer, des traitements ont été développés et approuvés, notamment des anticorps dits « Immune Checkpoint Inhibitors » (ICI). Malheureusement, ces anticorps ne sont efficaces que dans un nombre limité de patients. Plusieurs études et essais cliniques sont donc en cours visant à combiner les ICI avec des chimio-ou radio-thérapies, ou explorant de nouvelles immunothérapies, agissant notamment sur les cellules de l'immunité innée.

Les inflammasomes sont des complexes protéiques centraux à l'immunité innée. A ce jour, 8 différents inflammasomes ont été caractérisés. Nous proposons que les inflammasomes jouent un rôle potentiel dans la réponse aux ICI, et notamment dans la régulation du microbiome qui semble être une composante importante dans la réponse à ces traitements. Ainsi, nous évaluerons le rôle des inflammasomes dans la réponse aux ICI et nous déterminerons leur mode d'action.

Afin de réaliser l'ensemble de nos expériences, 2772 souris sont demandées sur une période de 5 ans. Dans le respect des règles des 3R,

Remplacer Des méthodologies de culture cellulaire et de modélisation *in vitro* ont été mises en place afin de remplacer au possible l'utilisation d'animaux pour répondre à certaines questions spécifiques à ce projet. Cependant seul un modèle *in vivo* chez la souris récapitulant les éléments de la physiopathologie du cancer et regroupant les multiples acteurs de l'immunité innée/adaptative observés chez l'homme, permettra de vérifier l'hypothèse sur l'implication de l'inflammasome dans la réponse aux ICI en synergie avec le microbiome.

Réduire Pour nos expériences, nous avons prévu le nombre nécessaire et suffisant d'animaux, pour garder une puissance statistique dans le traitement des résultats et avoir le nombre de contrôles internes obligatoires, pour prouver l'efficacité des molécules thérapeutiques utilisées. De plus nous utilisons les animaux mâles et femelles ce qui réduit de 50% l'utilisation des animaux.

Raffinement Afin de respecter la notion de raffinement, et éliminer ou réduire toute douleur, souffrance, angoisse, ou tout dommage durable, susceptible d'être infligé aux animaux, leur bien-

être et leur souffrance seront pris en compte quotidiennement de leur naissance à leur mort et évalués par le personnel zootechnique expérimenté. Ainsi, pour chaque procédure impliquant une douleur supérieure à celle d'une piqûre, les animaux seront anesthésiés. De plus, chaque cage (type 2L avec 5 souris par cage) recevra du matériel pour nidifier dans le but de rétablir le répertoire comportemental des souris.

15713 Contexte : Le diabète est en pleine expansion dans notre société. Or le diabète entraîne très souvent des complications cardiaques avec notamment l'apparition d'un mauvais fonctionnement du cœur, appelé cardiopathie diabétique, et pouvant mener à l'insuffisance cardiaque. Une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans cette dysfonction représente un challenge important pour les chercheurs et les cliniciens afin d'améliorer la qualité de vie des patients.

Nous avons précédemment mis au point un modèle de souris diabétiques qui présentent le même dysfonctionnement du cœur que les patients diabétiques. Grâce à ces souris, nous avons démontré que la mitochondrie, une structure importante pour la production d'énergie dans la cellule du cœur, n'était plus capable de produire assez d'énergie pour permettre la contraction de la cellule cardiaque et donc du cœur. Plus précisément, la concentration en calcium, un messager nécessaire pour produire l'énergie, est diminuée dans les mitochondries des cellules du cœur chez les souris diabétiques.

Objectifs : Notre projet a pour objectif général d'explorer une nouvelle piste thérapeutique pour améliorer la fonction contractile du cœur diabétique. Nous proposons de rétablir la concentration en calcium dans la mitochondrie grâce à un médicament capable d'augmenter l'entrée du Ca^{2+} dans la mitochondrie. Tout d'abord, pour vérifier le rôle direct de la baisse de calcium dans la mitochondrie sur la mauvaise contraction du cœur et donc étendre nos résultats à la maladie de l'insuffisance cardiaque de toute origine, nous étudierons l'effet de l'expression dans le cœur de souris d'un espaceur entre la mitochondrie et le réticulum, une autre structure dans la cellule du cœur qui sert de réservoir de calcium, pour diminuer la concentration en calcium dans la mitochondrie et voir son effet sur la fonction contractile du cœur et sur le passage du calcium par des outils d'imagerie. Ensuite, nous testerons l'effet de notre médicament activateur de l'entrée de calcium dans la mitochondrie dans notre modèle de souris diabétiques pour déterminer le potentiel effet bénéfique sur la fonction contractile du cœur par échocardiographie et sur la communication du calcium. Ce projet comporte donc 5 procédures pour un total de 400 souris sur 5 ans.

Conformité à la règle des 3Rs :

Remplacement Notre projet ayant pour but d'étudier la cardiopathie diabétique impliquant un mauvais fonctionnement contractile du cœur, le recours à l'expérimentation animale est nécessaire. Toutefois, des mesures préalables sur lignées cellulaires ont permis de déterminer l'effet et la dose du médicament activateur de l'entrée de calcium dans la mitochondrie.

Réduction : Le nombre d'animaux par procédure a été calculé à l'aide d'un logiciel de statistiques afin de déterminer le plus précisément possible le nombre minimal d'animaux permettant d'obtenir des résultats statistiquement exploitables. Pour la procédure 1 de formation, celle-ci sera réalisée sur des animaux surnuméraires d'élevage. Pour les autres procédures, afin d'optimiser le recours aux animaux, ces derniers participent à plusieurs protocoles tout en veillant à minimiser au maximum la gêne et l'angoisse que cette succession de protocoles (pas ou peu invasifs) pourrait induire. De plus, le prélèvement d'organes autre que le cœur, à savoir muscle et foie, sera réalisé pour d'autres études au sein de notre laboratoire.

Raffiner Dans le but d'améliorer le bien-être des animaux et ce, dès leur arrivée dans notre animalerie, un enrichissement de milieu est mis en place et renouvelé très régulièrement. De plus, afin de supprimer la souffrance et la douleur, les injections sont réalisées sous prémédication analgésique et anesthésique local.

15714 Les leucémies aiguës lymphoblastiques T (LAL-T) sont des cancers agressifs du sang qui surviennent chez les enfants et les adultes. Bien que des traitements existent pour traiter cette maladie, dans certains cas la leucémie rechute sous une forme incurable et finit par être fatale.

L'origine et le développement de cette maladie sont liés aux cellules souches leucémiques, c'est-à-dire à des cellules qui prolifèrent de manière incontrôlée, en provoquant la maladie et la résistance aux thérapies conventionnelles.

Pour guérir les LAL- T d'une manière définitive et éviter la rechute il est donc indispensable de développer de nouveaux traitements capables d'éliminer les cellules souches leucémiques.

Nos données préliminaires, obtenues *in vitro* ont démontré que la relation entre les deux gènes, PTEN et ACLY, joue un rôle crucial dans le processus de formation des cellules souches leucémiques

Cette étude devrait nous permettre de confirmer ces données préliminaires et de développer de nouvelles thérapies pour éradiquer les leucémies et prévenir la résistance aux médicaments et les rechutes.

Etudier le développement de la leucémie signifie évaluer les mécanismes au travers lesquels les cellules leucémiques surviennent et prolifèrent dans un organisme sain. Ces études ne peuvent être réalisées *in vitro*, car le développement de la leucémie nécessite un microenvironnement médullaire qui joue en rôle clé dans le maintien des cellules souches leucémiques

Pour atteindre cet objectif, nous allons utiliser des souris modèles (délétion de PTEN et/ou ACLY) qui développent la maladie retrouvée chez les patients. L'analyse de ces souris nous permettra d'identifier le rôle des gènes PTEN et ACLY dans le développement de la maladie et dans la formation des cellules souches leucémiques.

Nous allons suivre le développement de la leucémie chez ces souris à travers des prises de sang hebdomadaires pour déterminer le pourcentage de cellules leucémiques circulantes. Quand le taux d'infiltration sera de 80%, les souris seront sacrifiées afin d'évaluer le développement de la leucémie dans leur organisme

Nous allons aussi évaluer le développement des cellules souches leucémiques en faisant des injections successives des cellules leucémiques à des souris receveuses. Ces études ne peuvent être réalisées *in-vitro*, car le développement de la leucémie nécessite un microenvironnement médullaire qui joue un rôle clef dans le maintien des cellules souches leucémiques.

Afin de réduire au maximum le nombre des animaux nécessaires à l'expérimentation nous allons mutualiser au sein de l'équipe les ressources cellulaires post-mortem afin qu'un même échantillon puisse être exploité pour différents projets et ainsi éviter l'utilisation itérative de souris.

Au total, nous utiliserons 420 souris pour ce projet qui va durer 5 ans.

Nous serons très attentifs au bien-être des animaux.

Nous veillerons à enrichir l'environnement des souris (carrés de coton pour la nidification, maintien dans la mesure du possible des groupes sociaux)

Afin de ne pas causer de douleur aux animaux, durant les protocoles expérimentaux un suivi quotidien sera mis en place (après le début du développement de la leucémie) afin de surveiller tous les signes évoquant la survenue d'une douleur importante, auquel cas l'animal sera sacrifié.

Pour éviter toute souffrance toutes les souris seront sacrifiées avant le développement complet de la leucémie.

En conclusion, le projet vise à identifier des cibles thérapeutiques nouvelles pour améliorer le pronostic de la leucémie aiguë lymphoblastique T et prévenir la résistance aux médicaments et les rechutes.

15715 Le vieillissement et la longévité sont des mécanismes biologiques fortement liés à l'apparition des maladies neurodégénératives, cardiovasculaires et des cancers. Ces mécanismes impliquent des processus biologiques complexes tels que les fonctions cardio-vasculaires, la dépense énergétique et le maintien en bonne santé tout au long de la vie de toutes les cellules qui forment notre corps. Bien que la nutrition soit capable de moduler le vieillissement et de modifier la durée de vie, la recherche a aussi démontré le caractère héréditaire et donc l'importance de certains gènes dans ces mécanismes. Nous avons identifié un nouveau gène X important pour ces mécanismes. Lorsque ce gène X est inactivé chez la souris, celles-ci présentent des signes caractéristiques de

longévité accrue tels qu'une absence de prise de poids en vieillissant, une meilleure santé cardiovasculaire et une meilleure préservation des performances physiques. Dans ce projet, nous souhaitons établir ce modèle de souris comme un nouvel outil pour étudier la longévité et en particulier le rôle du gène X dans la régulation de la durée de vie. Pour atteindre cet objectif, des souris sauvages et mutantes seront maintenues en vie jusqu'à leur mort naturelle afin d'évaluer les durées de vie moyenne et maximale. Des courbes de poids, de glycémie et des tests non-invasifs seront réalisés afin de caractériser les performances motrices et auditives de ces animaux. Aucune des expériences menées ne générera de souffrance animale puisque le but de l'expérimentation est de maintenir les souris vivantes le plus longtemps possible et dans les meilleures conditions d'élevage. Pour ce projet, un total de 940 souris dont 400 soumises à déclaration légale et réparties dans six procédures expérimentales sera nécessaire. La procédure 1 (160 souris) consiste à étudier l'impact de la mutation sur la durée de vie et les conditions physiques de l'animal lors du vieillissement. La procédure 2 (48 souris réduction possible à 18, 24 ou 36 selon les résultats de la procédure 1) consiste à étudier l'évolution de l'acuité auditive chez ces animaux au cours du vieillissement. La procédure 3 (64 souris réduction possible à 24, 32 ou 48 selon les résultats de la procédure 1) consiste à étudier la dépense énergétique chez ces animaux. La procédure 4 (64 souris réduction possible 32 selon les résultats de la procédure 1) consiste à étudier la régulation de la glycémie au cours du vieillissement. La procédure 5 (64 souris/32 si réduction possible) consiste à étudier la résistance au diabète lié à l'obésité. La procédure 6 (540 souris/360 si réduction possible) vise à analyser les tissus de ces souris au niveau moléculaire et cellulaire et n'est pas légalement soumis à déclaration. Afin de pouvoir réduire très significativement le nombre des animaux, une analyse pilote sera menée qui permettra de décider pour les expériences suivantes soit d'étudier les deux sexes de manière combinée, soit d'étudier un seul sexe. Cette procédure pourra réduire de moitié le nombre des animaux dans plusieurs des procédures. Concernant le remplacement des animaux utilisés, aucune stratégie ne peut être mise en œuvre à ce stade du projet. Concernant le raffinement, bien que ce projet n'implique pas de contraintes sévères aux animaux, une stratégie utilisant une grille d'évaluation basée sur des critères d'observation et tenant compte d'une souffrance éventuelle des animaux les plus vieux a été mise en place. Le projet respecte aussi les 5 règles de liberté des animaux en fournissant des conditions d'élevage appropriées (libre accès à la boisson et la nourriture, enrichissement du milieu, nombre d'animaux par cage limité). Ce projet pourra néanmoins avancer significativement la compréhension des mécanismes néfastes liés au vieillissement. Sur le long terme, les résultats attendus devraient permettre d'améliorer la qualité de vie des personnes, notamment en permettant une meilleure prévention des maladies associées au vieillissement.

15716 Notre système immunitaire a pour fonction de préserver l'intégrité de notre organisme en neutralisant les éléments qui viendraient perturber trop fortement l'équilibre maintenu avec notre environnement. Il arrive néanmoins que ce système se retourne durablement contre l'organisme lui-même il y a auto-immunité et seuls existent des traitements avec des effets indésirables et souvent de longue durée. Un sous-groupe de cellules T, dit régulateurs (Treg), qui patrouille dans l'organisme entier, pourrait contrôler de telles réponses immunes indésirables, ce qui suscite un grand espoir thérapeutique pour les maladies auto-immunes ou la transplantation d'organes. Néanmoins, les conditions de « vaccination » permettant le recrutement de telles cellules Treg sont encore mal connues. Par ailleurs, les vecteurs de thérapie génique AAV, bien tolérés chez l'homme, permettent désormais de corriger diverses maladies génétiques rares et connaissent donc un essor croissant. De manière intéressante, il a récemment été montré que les AAV pourraient également être capables de recruter des cellules Tregs.

Notre projet vise à développer une nouvelle stratégie thérapeutique basée sur l'administration de ces AAV pour mobiliser efficacement des cellules Tregs, ce qui pourrait permettre de guérir de multiples pathologies où le système immunitaire est exagérément actif. Cette approche n'ayant que très peu été abordée à ce jour, déterminer la stratégie optimale nécessitera tout d'abord de tester de multiples combinaisons de paramètres, du vecteur AAV lui-même à son mode d'administration, en passant par l'antigène. Nous déterminerons ainsi chez des souris « vaccinées » par des AAV, quelles sont les meilleures combinaisons pour recruter des cellules Treg. Cette sélection ayant été

faite, nous procéderons ensuite à deux types de vérifications 1) nous vérifierons la capacité des Tregs ainsi recrutés à promouvoir un effet thérapeutique et 2) nous vérifierons la provenance de ces Treg, qui peut avoir un impact sur la durée et la stabilité de leur pouvoir thérapeutique.

L'utilisation d'animaux est indispensable pour ce type d'étude. En effet, le système immunitaire, à travers des organes spécifiques, mais également le sang et la lymphe, se trouve imbriqué dans tout l'organisme, ce qui lui permet d'en contrôler l'intégrité. De ce fait, les réponses immunes sont la résultante de complexes interactions, impliquant de multiples partenaires cellulaires et se déroulant dans plusieurs organes. Ainsi, si certaines expériences *in vitro* permettent d'analyser certains processus et paramètres de ces réponses immunes, seul le modèle animal est à même de mimer la complexité de la réponse immunitaire résultante de l'injection d'un produit.

Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, la qualité des AAV sera préalablement testée *in vitro* avant toute étude extensive *in vivo*. Par ailleurs, les études cinétiques se feront tout d'abord sur 2 points de temps seulement, avant que seules les plus prometteuses des combinaisons ne soient étudiées dans le détail avec plus de points de temps. Enfin, les études mécanistiques ne se feront que sur une ou deux combinaisons optimales.

Ces études seront menées sur des modèles de souris exemptes de toute pathologie. De plus, à l'instar d'une vaccination classique, l'injection des AAV ne devrait pas générer la moindre souffrance pour l'animal. Notons que par ailleurs nos vecteurs AAV ont pour but de « calmer » le système immunitaire et donc de limiter toute inflammation. Ainsi, seules les interventions expérimentales et non les produits injectés pourraient entraîner d'éventuels signes de douleur ou de stress. Pour les prélèvements de sang, une anesthésie gazeuse légère sera préalablement réalisée et une compresse sera appliquée pour stopper d'éventuels saignements. Pour les injections intramusculaires, un mélange de 2 anesthésiques sera préalablement administré.

Notre projet durera 5 ans et nécessitera l'utilisation totale de 640 souris. Ce nombre est estimé en fonction d'une analyse statistique prédictive afin d'obtenir les résultats les plus robustes en impliquant le moins d'animaux possible. Une partie des souris sera achetée chez un éleveur agréé. Une autre sera générée par notre établissement utilisateur.

15717 La pneumonie acquise sous ventilation (PAVM) correspond à toute pneumonie survenant chez un malade dont la respiration est assistée par une machine de manière invasive par l'intermédiaire d'un tube endotrachéal dans les 48 heures précédant la survenue de l'infection.

Ses conséquences sont majeures sur la morbidité et la mortalité des patients de réanimation, la consommation d'antibiotiques et la durée d'hospitalisation, notamment en réanimation. Certains dispositifs médicaux sont utilisés dans le but de réduire l'incidence des PAVM. Le principal dispositif médical concerné est la sonde d'intubation et de son ballonnet. Toutes les évolutions qu'a connues ce dispositif ces dernières années font qu'une attention croissante est portée au choix de la sonde d'intubation (et de son ballonnet) dans l'optique de prévenir les PAVM.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'efficacité d'un nouveau composé à activité antimicrobienne (secret industriel) recouvrant une sonde endotrachéale sur la colonisation bactérienne dans la trachée, le poumon et sur la sonde.

Le Remplacement du modèle in-vivo est limité par les difficultés d'accès au poumon en recherche clinique, et des résultats limités obtenus avec un modèle *in vitro* sur cellules pulmonaires étirées, qui ne permet pas de reproduire l'infection, ni d'évaluer un système d'intubation.

Le lapin est un modèle privilégié pour une ventilation mécanique prolongée par les voies naturelles.

Dans un objectif de Réduction, le nombre d'animaux choisi (3/groupe) est le nombre minimal déterminé par des études préliminaires pour permettre une analyse statistique intergroupes. Le nombre de lapins sera de 7 sur 2 mois (à raison d'un lapin par semaine). Soit un groupe (n=3) intubé avec une sonde enduite, et un groupe témoin (n=3) intubé avec une sonde non enduite. Un lapin sera utilisé en supplément pour vérifier les paramètres de ventilation et de mise au point de l'infection.

Dans un objectif de Raffinement, chaque procédure (intubation, ventilation, inoculation, autopsie) sera réalisée sous anesthésie générale. Durant toute la procédure, l'animal est maintenu sur tapis chauffant pour éviter une éventuelle hypothermie liée à l'anesthésie. Dans notre modèle, aucune mortalité n'est attendue. Un suivi de la fréquence cardiaque à l'aide d'un appareil dédié (scope) permettra de dépister les variations de fréquence cardiaque et une possible dysfonction d'anesthésie pour y remédier rapidement avec une limite basse de 80 – 100 battements/minute. Au global, s'agissant d'une procédure sous anesthésie générale et n'induisant pas de mortalité ni de détresse particulière, aucun autre point limite n'est quantifiable.

15718 La sérotonine (5-HT) est une molécule que l'on appelle neurotransmetteur, c'est à dire qu'elle est produite entre autre par les neurones de notre système nerveux central (SNC) pour leur permettre de communiquer avec d'autres cellules, y compris d'autres neurones. De plus, la sérotonine peut être considérée comme un messenger entre le SNC (cerveau et moelle épinière) et l'ensemble de l'organisme, le système périphérique (SP). Les interactions entre ces deux systèmes, central et périphérique, sont au cœur de mécanismes inflammatoires impliqués dans des désordres neurologiques comme la maladie de Parkinson et la maladie de Sclérose En Plaques. Le rôle de la 5-HT comme modulateur de ces échanges est donc important pour limiter et prévenir l'inflammation et constitue un espoir thérapeutique de ces maladies.

La 5-HT agit à travers sept classes de récepteurs et les mécanismes impliqués sont encore mal compris. Notre étude porte sur l'un de ces récepteurs sérotoninergiques, le récepteur 5-HT7 (5-HT7R) aux propriétés intéressantes associées aux processus inflammatoires. Nous disposons d'un nouveau ligand (molécule synthétique capable de se fixer au récepteur et de l'activer tout comme la 5-HT) spécifique de ce récepteur, qui nous permettra d'évaluer chez des modèles murins de neuroinflammation, l'implication du récepteur d'intérêt dans la mise en place des mécanismes inflammatoires et les effets du ligand ainsi que son potentiel thérapeutique. Notre recherche chez l'animal, puis à l'échelle tissulaire cellulaire et moléculaire, vise à étudier le rôle immuno-modulateur du 5-HT7R à la fois dans le SNC et SP, et l'intérêt thérapeutique du ligand d'intérêt.

Nos objectifs sont de comprendre les mécanismes engagés par le système sérotoninergique et d'ouvrir une nouvelle stratégie thérapeutique, plus ciblée et efficace, pour le traitement des maladies neuroinflammatoires.

L'étude chez l'animal est indispensable à l'avancée de notre recherche compte tenu de la complexité des interactions cellulaires et moléculaires à l'origine des mécanismes inflammatoires, mais également des objectifs thérapeutiques que nous souhaiterions atteindre. La souris est un modèle de choix pour notre étude, en effet les mécanismes inflammatoires responsables des lésions neurologiques sont très similaires à ceux présents chez l'Homme. De plus, le récepteur 5-HT7 est présent chez l'Homme comme chez la souris.

Ce projet s'articule autour de deux procédures expérimentales, permettant la mise en place d'un contexte inflammatoire afin d'y étudier le rôle du récepteur 5-HT7, à l'échelle d'un organisme entier, puis d'un tissu spécifique et ensuite d'une population de cellules d'intérêt. La première procédure consiste à injecter à l'animal une molécule, le Lipopolysaccharide, responsable de la mise en place d'une inflammation généralisée, nous permettant ainsi d'étudier les mécanismes nécessaires à la mise en place de cette inflammation. La seconde procédure est l'utilisation du modèle d'Encéphalomyélite Auto-Immune Expérimentale, il s'agit du modèle de référence du développement de la Sclérose en Plaques chez la souris suite à l'injection d'un antigène combiné à un adjuvant. Ce modèle est une aide précieuse à la compréhension des interactions entre les cellules du système immunitaire, conduisant au développement de la réponse auto-immune.

Le nombre maximum de souris envisagé pour ce projet est de 1 380.

Pour chaque procédure, les souris feront l'objet d'un suivi stricte et quotidien basé sur la grille de score adaptée au modèle utilisé. Les points limites, précoces et adaptés, seront établis en amont afin de détecter et d'éviter l'état de souffrance des animaux. Dans la procédure 1, c'est à la durée maximale de l'expérience, c'est à dire 24h après l'injection de Lipopolysaccharide, que les animaux commencent à présenter une mobilité réduite ainsi qu'un état de prostration. C'est pourquoi, au

moment de l'injection, des croquettes mouillées seront mises à leur disposition dans la cage afin d'éviter toute déshydratation et une difficulté à s'alimenter. Concernant la procédure 2 et le modèle de référence de la Sclérose en Plaques chez la souris dont la durée est de minimum 18 jours, l'apparition des premiers signes cliniques de la maladie chez la souris apparaissent généralement aux 9-10^{ème} jours. Durant les 10 jours qui suivent, les animaux présenteront graduellement, une hypotonie c'est à dire une baisse globale du tonus musculaire, une boiterie légère, une paralysie partielle des pattes arrières, jusqu'à une paralysie totale. Compte tenu de l'évolution de la maladie, les animaux seront suivis tous les jours (signe clinique, poids) et des croquettes mouillées seront disposées systématiquement à partir du 10^{ème} jour. Le matériel d'enrichissement imposant, comme par exemple les tubes PVC, sera retiré pour limiter la gêne sur le déplacement des animaux. Une attention particulière sera accordée au respect de la règle des 3R

- Réduire les groupes expérimentaux contiendront 5 ou 10 souris chacun. Chaque nombre a été adapté en fonction des variabilités des analyses prévues. Pour les analyses biologiques dont la reproductibilité est forte, un nombre de 5 animaux par groupe a été attribué.

- Remplacer Le choix de la dose à utiliser *in vivo* pour chaque ligand a été déterminée en amont à partir d'expériences *in vitro* que nous avons réalisé au laboratoire

- Raffiner Les animaux seront suivis tout au long des procédures. En effet, l'aspect général extérieur de l'animal (posture, pelage, démarche, faciès, yeux) seront observés, associés au suivi des critères évalués par la grille de score adaptée aux procédures. Si des animaux présentent des signes de souffrance, ils seront retirés du groupe expérimental. Dans le cas où 5 animaux exclus font parti du même groupe expérimental (même traitement), alors ce groupe entier sera retiré de la procédure.

15719 L'insuffisance cardiaque (IC) frappe chaque année une à cinq personnes pour mille dans les pays industrialisés, tous âges confondus, avec une prévalence de trois à vingt pour mille. La survie à un an, tous stades confondus, est de l'ordre de 65 %. L'IC traduit un état pathologique progressif dans lequel la pompe cardiaque n'est plus capable d'assurer un débit sanguin suffisant pour satisfaire les besoins de l'organisme. Cette pathologie peut faire suite à une lésion du muscle cardiaque lors d'une souffrance provoquée par un infarctus du myocarde. Dans la semaine qui suit l'obstruction d'une artère coronaire qui irrigue le cœur, le tissu cardiaque n'est plus alimenté en sang ni en oxygène. Asphyxié et lésé, il subit une profonde réorganisation, appelée remodelage cardiaque. Ce processus fait suite à l'apparition d'une zone de mort cellulaire et d'une cicatrice, liées à une régénération tissulaire imparfaite, au sein desquelles la contraction ne se fait plus. Le remodelage est en grande partie déterminé par la réponse inflammatoire d'une part et par une modification de l'innervation du cœur par les nerfs qui en régulent la fonction d'autre part. L'infiltration du tissu cardiaque par certaines cellules immunitaires pro-inflammatoires, comme les neutrophiles et les monocytes, a lieu dès le premier jour qui suit l'infarctus, de manière concomitante à la perte d'une partie de l'innervation du cœur. Améliorer la régénération tissulaire cardiaque après un infarctus afin de limiter ce remodelage négatif est une des pistes thérapeutiques actuelles les plus passionnantes. La colchicine, extraite de la colchique, est un traitement bien connu de la goutte et de la douleur qui y est associée lors des crises. Elle pourrait avoir un effet anti-inflammatoire, comme il a déjà été montré qu'elle avait un effet sur la dénervation dans un modèle animal reproduisant l'obstruction transitoire d'une artère coronaire (situation mimant l'infarctus humain avec prise en charge thérapeutique décrite dans une précédente saisine déposée par notre laboratoire). Notre hypothèse est que la colchicine exerce un effet anti-inflammatoire direct et bénéfique sur le devenir des lésions cardiaques en limitant la dénervation cardiaque non seulement dans la phase aiguë mais également dans la phase tardive.

Nous utilisons un modèle de souris d'IC chronique développée à la suite d'un infarctus permanent chez des souris wild type (C57BL/6) et des souris immunodéprimées (Rag2KO ou autre lignée). Malgré son caractère délétère, cette intervention est nécessaire pour reproduire dans un système intégré les différentes composantes de la pathologie humaine, gage d'une meilleure transposition vers la clinique dont le besoin de nouveaux traitements est urgent. Ces souris seront traitées ou non (colchicine ou traitements conventionnels de l'IC), et les données biologiques issues de cette étude permettront de mieux comprendre les mécanismes du remodelage lors du traitement

pharmacologique. Une analyse raisonnée du nombre de souris utilisées a conduit à prévoir un nombre total de 496 souris dans le respect du principe de la règle des 3 R. La physiologie cardiovasculaire des rongeurs présente de grandes similitudes avec celle de l'homme en terme de régulation et de structure morpho-fonctionnelle. Cependant, si le modèle animal demeure à ce jour inévitable pour étudier l'inter-relation entre la souffrance cardiaque, les cellules du système immunitaire et les projections du système nerveux, nous veillerons toutefois à Remplacer notre stratégie dès lors qu'une alternative serait identifiée pendant la réalisation de nos travaux.

Nous avons organisé nos expériences pour Réduire au maximum le nombre d'animaux nécessaires à l'acquisition des données (calcul statistique de l'effectif minimal, utilisation des mêmes souris pour plusieurs expériences, choix de l'échocardiographie pour le suivi de la fonction cardiaque). Enfin, nous avons Raffiné nos approches pour réduire au strict minimum la détresse imposée à ces animaux, et pour apprécier au mieux les points limites (mise en place d'une grille d'évaluation des signes de douleurs; visites quotidiennes et soins par du personnel qualifié), en utilisant une anesthésie et analgésie pré- per- et post-opératoire afin d'éviter la génération de douleur et d'angoisse. Les animaux sont stabulés par cage de 4 sur des portoirs ventilés dans une pièce de l'animalerie agréée A1, sous contrôle permanent des températures, hygrométrie et sous un cycle de lumière (12/12h). En terme d'enrichissement, des plaques de cotons de cellulose (safe square) leur permettant de faire des nids sont ajoutés et les animaux ont des cabanes en plexiglass teinté. Les animaux ont accès à la nourriture et l'eau ad libitum. Ils font l'objet, au sein de notre animalerie, d'une surveillance quotidienne, jours de semaine et week-ends par du personnel qualifié.

15720 Ce projet est centré sur la mise en évidence du rôle clé d'une enzyme métabolique HMGCL dans l'établissement et les capacités métastatiques des cellules tumorales pancréatiques. Cette mise en évidence permettra d'ouvrir de nouvelles fenêtres de diagnostic et/ou la thérapie de ces tumeurs extrêmement agressives, quasi-incurables, représentant 80% des tumeurs du pancréas.

HMGCL est une enzyme permettant la production de corps cétoniques (B-hydroxybutyrate et acétoacétate). Cette enzyme sur exprimée dans les tumeurs à la fois chez l'homme et la souris, agit à l'intermédiaire de deux grandes voies à savoir celle de dégradation des acides gras et celle de dégradation de la leucine. Les acides gras ont été montrés comme étant pro-tumoral dans le cas de l'adénocarcinome pancréatique (ADKP) à de nombreuses reprises dans la littérature. De même, la leucine qui fait partie des acides aminés à chaînes branchées, a été montré comme étant présente de façon plus importante dans le plasma des patients avant que ces derniers ne soient diagnostiqués pour un ADKP. Lors de nos expériences *in vitro*, nous avons pu déterminer que l'absence d'HMGCL engendrait une diminution des capacités clonogéniques mais aussi migratoire et invasive des cellules tumorales. De plus, nous avons en première intention utilisé les techniques *in ovo* de façon à confirmer que les cellules tumorales en absence d'HMGCL formaient moins de métastases en comparaison avec le groupe contrôle. En parallèle du blocage d'HMGCL, les tests de survie cellulaire ont mis en évidence le rôle pro tumoral du B-hydroxybutyrate et de la leucine sur les cellules tumorales pancréatiques.

Ainsi, l'objectif de ces expériences *in vivo* sera double. D'une part, nous souhaitons prouver l'effet pro tumoral des corps cétoniques et de la leucine dans le cas d'un ADKP spontané (souris génétiquement modifiées, PKI) à la fois sur la tumeur elle-même mais aussi sur les métastases. D'autre part, nous souhaitons valider la perte d'agressivité des cellules tumorales en absence d'HMGCL via l'utilisation de greffe dans le pancréas de cellules humaines délétées pour HMGCL. Les expériences relatives à ces deux études nécessitent d'être réalisées à partir de modèles murins d'ADKP induits ou spontanés reproduisant au mieux les caractéristiques de l'ADKP humain. Le nombre d'animaux par groupe expérimental a été réduit au minimum requis pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs permettant de démontrer *in vivo* une forte augmentation des tumeurs et des métastases chez les souris traitées avec du B-hydroxybutyrate ou avec un régime enrichi en leucine, ou une réduction significative du poids/volume tumoral chez les souris greffées avec des cellules tumorales délétées pour HMGCL comparés au groupe contrôles (souris injecté avec des cellules tumorales humaines contrôles) et l'effet de sauvetage du phénotype par l'injection de B-hydroxybutyrate. Au total, 333 souris seront requises pour les 6 procédures décrites. Dans

une volonté de réduire le stress de l'isolement, les souris seront élevées par groupe de 4 souris par cage, les souris ayant subi une greffe seront placées 1 par cage pour éviter un arrachement des points et seront en présence d'un enrichissement matériel (tunnel/maison en carton, coton/papier) de l'environnement afin d'exprimer un répertoire diversifié de comportements normaux. Pour réduire au mieux les douleurs possibles liées aux actes chirurgicaux, nous utiliserons des anesthésiant avant l'opération et des analgésiques après opération. Lors de l'observation quotidienne nous établirons un score de douleur en nous assurant que les animaux ne présentent pas de pertes de poids de plus de 20%, signe de douleur ou souffrance notable (comme par exemple animal prostré, défaut de toilette, troubles cardiaques, troubles respiratoires), ces différents points constitueront des points limites à l'expérience. Toutes ces actions sont mises en place afin de respecter la règle des 3Rs visant à raffiner, à réduire et remplacer les expérimentations animales.

15721 La consommation irraisonnée de régimes alimentaires « occidentaux » à pourcentages glycémique et lipidique élevés associée à une diminution de la consommation de légumes, fibres, céréales et pain a conduit à une augmentation de la prévalence de l'obésité. Ces régimes occidentaux obésogènes sont dangereux pour la santé car excessifs en quantité d'acides gras saturés mais aussi d'acides gras polyinsaturés (AGPI) de type oméga-6 d'origine animale pouvant altérer l'intégrité de la paroi des artères coronaires. En plus de cet excès quantitatif d'oméga-6 observé dans l'obésité, un aspect qualitatif a émergé le non-respect d'une certaine balance oméga-6/oméga-3 (Ω -6/ Ω -3) pourrait prédisposer au développement inflammatoire en lien avec l'obésité, ainsi qu'aux maladies associées (maladies cardiovasculaires, accident vasculaire cérébral).

Ces 40 dernières années ont été marquées par une élévation drastique du ratio Ω -6/ Ω -3 dans l'alimentation des français qui se situe aujourd'hui aux alentours de 8. Les oméga-3 à longue chaîne sont présents en abondance dans les poissons gras comme le maquereau, le hareng, la sardine, l'anchois, le thon ou encore le saumon. Ces poissons gras sont néanmoins sujets à des contaminations par du mercure ou des PCB (polychlorobiphényles) qui en fonction de la taille de ces poissons, peuvent devenir toxiques. Les taux de PCB ont diminué ces dernières années mais les taux de mercure présents dans le poisson continuent à augmenter de 4,8 % par an. Ceci pose un problème environnemental et de santé publique important et nous incite à favoriser la consommation d'un précurseur des AGPI oméga-3 d'origine végétale, afin de s'affranchir de ces problèmes de contamination par des PCB et du mercure.

Dans ce projet, nous souhaitons mettre en évidence que la nature des lipides contenus dans différents régimes hyperlipidiques avec des rapports Ω -6/ Ω -3 plus ou moins délétères (enrichis en beurre, tournesol, soja/maïs, colza ...) affecte les profils inflammatoires circulants et centraux en comparaison à un régime standard. De plus, nous voulons montrer que l'activation des cellules gliales (astrocytes et/ou microglie) participe aux effets délétères centraux induits par la consommation à long terme de régimes obésogènes et que ces effets sont réversibles. Enfin, nous souhaitons montrer que la nature des lipides contenus dans ces régimes obésogènes active de manière différentielle les astrocytes et/ou la microglie.

Dans ce projet, nous allons donc chercher à caractériser la réponse inflammatoire induite par différents types de régimes hyperlipidiques (après 8, 12 et 16 semaines de régimes) et définir si l'inhibition de cette activation pourrait prévenir l'apparition de l'obésité. Nous utiliserons 852 animaux âgés de 8 semaines. Les animaux sont hébergés soit dans des grandes cages de 800 cm² (par 10) soit dans des cages moyennes de 530 cm² (par 2). Toutes les cages sont enrichies avec 1 à 2 igloo(s) et du coton.

Ce projet se justifie pleinement d'un point de vue scientifique et obéit à la règle des 3R

Remplacement L'étude de l'obésité nécessite un système intégré affectant simultanément plusieurs tissus (foie, tissus adipeux, pancréas, muscles et cerveau). L'obésité n'est donc pas pour l'instant modélisable *in vitro*. Il est par conséquent impossible aujourd'hui de pouvoir réaliser notre étude sur la réponse inflammatoire autre que dans un contexte *in vivo* global. Le développement de l'obésité, et plus généralement la régulation du poids corporel, fait appel à plusieurs organes et processus

intégrés. En fonction des données bibliographiques, notre étude doit donc nécessairement se faire sur l'animal entier.

Réduction Le nombre de souris a été réduit autant que possible, tout en étant suffisant pour l'obtention de résultats statistiquement exploitables (basé sur nos expériences et un calcul statistique pour trouver un effet significatif). Un nombre minimum d'animaux sera utilisé dans nos protocoles expérimentaux en respectant strictement ces différents points : (i) Utilisation d'un groupe de souris contrôles commun pour plusieurs séries d'études chaque fois que cela est possible. (ii) multi-prélèvements et création d'une base d'échantillons (cerveau et sang avant sacrifice).

Raffinement Les animaux seront hébergés dans des cages sur portoirs, avec nourriture et boisson ad libitum. Avant expérimentation, les souris seront acclimatées pendant une à deux semaines durant lesquelles les expérimentateurs les habitueront à être manipulées. A partir du début de l'expérience, les animaux seront pesés 3 fois par semaine afin de suivre leur poids. Les expérimentateurs évalueront aussi l'état général des souris quotidiennement afin de déterminer la présence ou non de signes de stress ou de souffrance (attitude soumise, dos voûté, respiration difficile, extrémités pâles, démarche anormale, diarrhée, vocalises...). En cas de stress ou de souffrance, les animaux seront soignés selon la sévérité de la douleur observée et en cas où les signes de souffrance persisteraient, les animaux souffrants seront euthanasiés. Une fiche d'observation et une grille d'évaluation de l'état de nos souris ont été établies.

15722 Pour les pays hors zone Europe (ainsi que pour les OGS), la vérification de l'efficacité de chaque lot de vaccin fabriqué, est demandée par les autorités réglementaires de ces pays et évaluée par un essai avec épreuve virulente décrit par la Pharmacopée européenne chez le rongeur.

Une procédure est décrite dans le présent projet :

Essai d'activité sur une espèce de rongeur dans le cadre strict du contrôle qualité de chaque lot de fabrication du vaccin et de son suivi de stabilité, validation des souches d'épreuve utilisées dans la procédure précédente.

Ce projet est conçu en accord avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement (3R), avec notamment l'utilisation d'animaux témoins communs au test d'activité de plusieurs lots, de manière à réduire le nombre global d'animaux utilisés, l'enrichissement apporté dans les cages des animaux, la définition de points limites adaptés permettant la réduction de la souffrance chez les animaux.

La procédure est classée en gravité sévère.

Le nombre d'animaux utilisés dans l'ensemble du projet sera au maximum de 3500 rongeurs.

15723 En France, l'accident vasculaire cérébral (AVC) ischémique, c'est à dire l'occlusion d'un vaisseau cérébral par un caillot sanguin, touche une personne toutes les 4 minutes. Les conséquences d'un AVC sont sévères 25% des patients décèdent de leur AVC, 40% garderont un handicap et 25% développeront une démence. Les seuls traitements disponibles sont soit l'administration d'un médicament permettant de dissoudre le caillot de sang soit un dispositif médical permettant de le retirer mécaniquement. Malheureusement, ces traitements ne sont possibles que lors des 6 premières heures après la survenue de l'AVC ce qui limite considérablement leur utilisation. Il est donc essentiel de développer de nouveaux traitements pour étendre la fenêtre thérapeutique à la phase aiguë de l'AVC, mais aussi pour améliorer la réparation et /ou la récupération des dommages neurologiques post AVC. Des études récentes ont montré que des thérapies ciblant l'inflammation cérébrale pouvaient stimuler le remodelage cérébral et favoriser la récupération post AVC à long terme, sur le plan de la motricité mais aussi en limitant/empêchant la démence.

Un caillot sanguin est formé essentiellement de plaquettes. Ces dernières jouent un rôle essentiellement dans la coagulation du sang mais sont de plus en plus reconnues comme des modulateurs pertinents d'autres processus physiopathologiques, tels l'inflammation et la régénération tissulaire. A ce jour, leur contribution à la réparation neurovasculaire n'a été que très peu étudiée et uniquement à la phase aiguë. Étant donné que les plaquettes peuvent produire des

facteurs favorisant le remodelage cérébral et/ou neuroprotecteurs, elles pourraient être impliquées dans les processus de remodelage cérébral après un AVC.

Les objectifs de ce projet seront de déterminer d'une part la contribution des plaquettes dans les processus de remodelage et de réparation neurovasculaire post AVC à long terme et d'autre part l'effet de nouveaux traitements anti-plaquettaires sur cette réparation. Pour cette étude, nous utiliserons un modèle d'ischémie cérébrale chez la souris traitée ou non avec les agents anti-plaquettaires. Sous anesthésie et analgésie, les souris subiront une ischémie cérébrale par occlusion d'une artère suivie d'une IRM cérébrale 3 jours après, toujours sous anesthésie, pour vérifier la présence d'un infarctus. Des prélèvements sanguins seront également effectués à différents temps et le suivi neurologique de l'animal sera réalisé. Les animaux seront euthanasiés en fin d'étude et les tissus seront prélevés et stockés pour les analyses cellulaires (type des cellules), biochimiques et histologiques.

Le recours au modèle animal est justifié car aucune approche *in vitro* ne permet de rendre compte des processus de réparation neurovasculaire après ischémie cérébrale au cours du temps. Ce modèle d'AVC n'est à l'heure actuelle pas remplaçable. Ce projet nécessite 552 souris mâles pour l'ensemble des procédures expérimentales sur une période de 5 ans, ce nombre ayant été élaboré en respectant la règle des 3R (remplacer, réduire, raffiner). Ce nombre rend compte des différents groupes (type de souris, type de médicaments) et le fait que certaines procédures sont impossibles à faire chez le même animal et imposent des groupes d'animaux différents. Les groupes ont été conçus de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Un calcul statistique du nombre de sujets nécessaires a été réalisé afin d'évaluer le nombre d'animaux à inclure pour obtenir des résultats significatifs tout en minimisant ce nombre. Ces calculs ont été possibles grâce aux résultats antérieurs obtenus avec ces modèles animaux. Le soin et le suivi des animaux seront faits par des personnes compétentes et expérimentées. La douleur sera évaluée par la mise en place de points limites bien définis à l'aide d'une grille de score. En cas de douleurs, l'administration d'antalgique et d'analgésie sera réalisée. Si la douleur persiste, l'animal sera euthanasié

15724 Les récepteurs à la ryanodine (RyR) sont des protéines permettant une fois que la cellule a été excitée électriquement de libérer du calcium dans le milieu intracellulaire des cellules constituant les muscles et qui sont responsables de la contraction (cellules musculaires). Cela a pour effet d'initier ce processus de contraction. Il existe 3 types de ces récepteurs dont les RyR1 et les RyR2. Les RyR1 sont présents majoritairement dans les cellules musculaires liées au squelette permettant au corps de se mouvoir. Les RyR2 sont exprimés dans les cellules musculaires du cœur et permettant d'envoyer le sang dans l'organisme. Des mutations ou diminution de la quantité des RyR1 conduisent chez les patients à des atrophies et faiblesses musculaires dans de nombreux syndromes, rendant tous mouvements difficiles. Néanmoins et d'une manière surprenante, cela est également à l'origine chez certains patients d'une hypertrophie cardiaque et des troubles électriques dit troubles de la conduction qui peuvent dégénérer en arythmies cardiaques. Communément, ces patients présentent également des troubles respiratoires progressifs qui peuvent conduire à la défaillance respiratoire. L'origine et le mécanisme de ces altérations structurales et électriques cardiaques engendrées par un défaut des RyR1 sont non connus. Les voies de signalisation conduisant progressivement à la défaillance respiratoire ne sont pas précisément établies. Le but de ce projet est d'une part d'étudier *in vivo* les conséquences cardiaques induites par une inactivation des gènes RyR1 dans les muscles du squelette dans un modèle murin, par mesure de l'électrocardiogramme, et d'autre part de caractériser la fonction respiratoire chez ces animaux par mesure des flux respiratoires (pléthysmographie). Un suivi de la fonction motrice spontanée sera effectué en parallèle. *Ex vivo*, les conséquences cellulaires de cette inactivation seront étudiées sur des cellules musculaires isolées et fibres musculaires de diaphragmes et de muscles de la patte. N'existant pas de méthode substitutive qui puisse éviter de recourir à l'usage d'animaux, cette étude sera réalisée en accord avec le principe des 3R avec notamment le but de réduire le nombre d'animaux (n=245 au total, en utilisant un même animal pour plusieurs mesures), en utilisant des systèmes de mesure non- ou faiblement invasifs et en prenant grand soins des conditions d'hébergement des animaux depuis le respect des tailles réglementaires des cages, des conditions

de température et hygrométrie ainsi que la mise en place d'enrichissement et de visites. Ces essais seront conduits dans un établissement utilisateur agréé, par du personnel qualifié et compétent en expérimentation animale. Le bien-être animal sera une préoccupation majeure dans ce protocole depuis l'accueil des animaux, leurs hébergement et manipulation. La mise en place du dispositif de mesure de l'électrocardiogramme sera réalisée sous anesthésie générale gazeuse (Aerane, isoflurane 2.5% dans O₂). Une grille d'évaluation quotidienne des signes cliniques permettra le suivi des animaux et les actions à mener (points limites selon grille en annexe), tout au long du protocole.

15725 La maladie de Menkes est une maladie très rare dont l'incidence est estimée à 1 patient pour 250 000 naissances. Cette maladie est provoquée par une mutation du gène ATPase 7a qui est localisé sur le chromosome X. L'ATPase 7A est le transporteur intestinal et cérébral du cuivre et son absence entraîne chez l'enfant une carence multisystémique et cérébrale en cuivre, générant une hypotrophie sévère, des cheveux caractéristiques fins et tortillés et une encéphalopathie convulsivante sévère qui est la cause du pronostic très grave de cette maladie.

Le cuivre est un métal impliqué dans un grand nombre de réactions intervenant dans la respiration cellulaire, le métabolisme du fer, le métabolisme des pigments, des neurotransmetteurs, la synthèse de certains peptides, de certains tissus conjonctifs et les réactions anti-oxydantes. La carence en cuivre s'exprime par un déficit de ces différentes activités biologiques.

Le seul traitement actuel pour les patients réside dans l'administration parentérale d'histidinate de cuivre, ce qui permet une normalisation du taux de céruléoplasmine (transporteur plasmatique du cuivre) mais sans amélioration de l'état clinique neurologique des patients car le produit ne passe pas la barrière hémato-méningée.

L'autre piste est la thérapie génique du gène ATPase7B, mais les quelques essais publiés ne sont pas concluants pour l'instant.

Il existe plusieurs modèles murins de la maladie de Menkes. Le modèle de souris MOblo est une souris présentant une mutation spontanée qui entraîne une carence en cuivre chez les mâles caractérisés par un pelage clair avec des poils anormaux, des tremblements et une apathie importante. Ils ont des anévrysmes aortiques et une dysplasie squelettique. La mortalité périnatale des mâles atteints est importante avec une durée de vie allant jusqu'à 3 à 5 semaines.

Notre objectif est de tester chez la souris MOblo une nouvelle piste thérapeutique basée sur l'administration répétée par voie sous-cutanée d'un transporteur synthétique du cuivre (TSC), capable de franchir la barrière hémato-encéphalique. Les injections sous-cutanées, au niveau de la peau de la nuque, seront effectuées sur les souriceaux mâles sauvages et mutants, tous les 3 jours à partir du 5^e jour après naissance et jusqu'à 8 semaines. L'évaluation de l'efficacité de ce traitement repose sur l'augmentation de la durée de vie, une amélioration du développement physiologique et une analyse des résultats des dosages biochimiques, anatomopathologiques et enzymologiques réalisés sur les tissus après mise à mort des animaux.

Cette étude préliminaire consistera à évaluer dans un premier temps le niveau de tolérance à ce TSC en injectant chez des souriceaux témoins des doses croissantes et répétées. En fonction des résultats obtenus, les souriceaux mâles Moblo souffrant de la maladie de Menkes seront traitées avec différentes doses de TSC ne dépassant pas les doses maximales définies lors de la première étape afin d'établir les doses efficaces pour restaurer une concentration de cuivre proche de la normale au niveau du cerveau.

1. Remplacement il n'existe pas d'alternative d'approche *in vitro* car le projet porte sur l'étude de l'allongement de la durée de vie et l'évaluation de l'état physiologique de l'animal porteur de la maladie de Menkes en fonction de la réponse au traitement.

2. Réduction Ces tests de tolérance au TSC en doses croissantes nécessitent 5 animaux par groupe d'étude, au nombre de 12, ce qui représente 40 animaux de type sauvage et 20 mâles mutants hémizygotés traités dans les mêmes conditions.

3. Raffinement toutes les procédures expérimentales (traitement pharmacologique, mise à mort) auront lieu dans l'animalerie, et les animaux seront regroupés à 4 par cage à partir du sevrage, afin d'éviter le sentiment d'isolement. Les animaux ont accès à la nourriture et la boisson sans

restriction, et ils sont hébergés dans des cages standard de 500 cm² au sol en portoir ventilé, pourvues de litière enrichies en divers éléments (maisonnettes, buchettes de bois, matériel de nidification). De manière générale, une procédure d'estimation et suppression du mal être est mise en place, en évaluant pour chaque animal un score qui est comparé au point limite défini et fixé au préalable et qui tient compte des signes éventuels de mal-être. Les mères hétérozygotes ne subiront aucun traitement délétère mais nous surveillerons particulièrement l'attachement et le soin qu'elles apporteront à leurs souriceaux qui subiront le traitement pharmacologique. Le cas échéant, nous remplacerons ces souriceaux dans d'autres portées où les mères se montrent plus attentionnées. Les souriceaux traités, particulièrement ceux qui sont porteurs de la mutation, seront observés avec attention, notamment en ce qui concerne les signes tels que l'isolement, les yeux fermés, le dos voûté, les poils hérissés, ainsi que l'immobilité et le déséquilibre qui sont des signes caractéristiques de la maladie. Deux procédures seront appliquées, la gestion de la lignée mutante qui présente un phénotype dommageable pour l'animal, et l'injection du TSC en sous-cutanée et répétée tous les 3 jours. En fin de protocole, les animaux seront mis à mort et des organes prélevés pour permettre des analyses biochimiques, enzymologiques et anatomopathologiques.

15726 Les maladies auto-immunes représentent aujourd'hui la troisième cause de mortalité dans les pays développés, après les affections cardio-vasculaires et les cancers. Il existe plus de 80 maladies auto-immunes parmi lesquelles les maladies inflammatoires du système nerveux central, telle que la sclérose en plaque, pour lesquels les traitements sont encore non satisfaisants. En effet, la prise en charge de cette maladie fait appel à des traitements présentant de nombreux effets indésirables et une efficacité insuffisante pour lutter contre la progression de la maladie. Cette pathologie est due à un dysfonctionnement du système immunitaire qui entraîne des lésions au niveau du système nerveux central et provoque des perturbations motrices, sensibles et cognitives. La sclérose en plaque est une maladie invalidante touchant le système nerveux central, caractérisée par une démyélination, une inflammation et une dérégulation immunitaire. Cette pathologie est médiée par des lymphocytes T présentant une auto réactivité contre les protéines de la myéline et par l'activation de cellules B produisant des anticorps autoréactifs. Cette perte de tolérance au soi accompagnée d'un défaut et d'une dysfonction des cellules T régulatrices, et d'une résistance des cellules T effectrices à la suppression, entraînent un déséquilibre immunitaire responsable de la pathogénèse de la sclérose en plaque.

Les traitements visant à augmenter le nombre de lymphocytes T régulateurs ou à restaurer leur activité suppressive sont des stratégies thérapeutiques potentielles et prometteuses.

Des études antérieures menées par notre équipe ont montrés que l'on pouvait expandre les lymphocytes T régulateurs CD8 *in vitro* et que cela augmentait leur fonction suppressive. De plus ces cellules peuvent être génétiquement modifiées pour exprimer un CAR (Chimeric Antigen Receptor) sans affecter leur phénotype régulateur. Un CAR est constitué de la partie variable d'un anticorps et d'un domaine intracellulaire co stimuloire et de signalisation. D'autres études ont montrés que le CAR permettait aux cellules de migrer préférentiellement dans les tissus exprimant l'antigène ciblé et que sa reconnaissance entraînait une activation de ces cellules. Notre équipe a montré que des CAR Tregs sont capables d'induire une tolérance dans un modèle de greffe de peau et de GvHd (Graft versus Host disease) chez la souris humanisée.

L'objet de cette saisine est d'évaluer le potentiel d'une thérapie cellulaire sur les réponses immunes intervenant dans l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) induite par la glycoprotéine MOG (myelin oligodendrocyte glycoprotein), modèle préclinique de sclérose en plaque chez la souris déjà développé au sein du laboratoire. Le modèle EAE mime la pathologie humaine de la sclérose en plaque où l'on observe des périodes de poussées puis des périodes de rémission complète (sans symptômes) ou partielle. Dans le modèle EAE, cela se traduit par une paralysie ascendante. On observe un pic de la gravité de la maladie (paralysie et perte de poids) suivie d'une amélioration des symptômes de paralysie et d'une prise de poids. Cette thérapie cellulaire consiste à utiliser des lymphocytes T CD8 régulateurs (CD8 Tregs) génétiquement modifiés pour exprimer un CAR spécifique de la protéine MOG (MOG-CAR CD8 Treg). L'administration de cette thérapie cellulaire à des souris atteintes d'EAE, devrait permettre la migration des lymphocytes T régulateurs

au niveau du site d'inflammation et leur activation afin de rééquilibrer les réponses régulatrices et effectrices, et ainsi réduire les atteintes neuro-inflammatoires.

Les résultats obtenus permettront d'établir une preuve de concept quant à l'utilisation de CAR-MOG CD8 Treg en thérapie cellulaire dans le contrôle des réponses immunes, dans une situation pathologique où la fonction des T régulateurs joue un rôle majeur.

Dans cette saisine, la règle des 3R sera suivie comme suit

- Remplacer A ce jour, aucune expérience *in vitro* ou modélisation informatique ne permet de rendre compte d'une maladie auto-immune telle que la sclérose en plaque.

Concernant les CAR Tregs, même si les résultats obtenus dans des analyses fonctionnelles *in vitro* sont prometteurs, ils ne peuvent pas prédire complètement et précisément les effets *in vivo*, du fait de la complexité du système immunitaire et de l'absence du contexte physiologique.

- Réduire Le nombre d'animaux par groupe est réduit au nombre nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats robustes et statistiquement significatifs (description des tests statistiques utilisés détaillée ci-après). Le nombre de groupes a été réfléchi de sorte à avoir les contrôles suffisants pour pouvoir conclure quant aux résultats obtenus.

Le nombre total maximum d'animaux escomptés pour le test de thérapie cellulaire avec des CAR Tregs spécifiques de la protéine MOG dans le modèle d'EAE est de 224 souris, le modèle murin d'EAE induite par le MOG étant précédemment mis au point par le laboratoire et donc opérationnel.

-Raffiner Durant le protocole, les animaux seront suivis pour leur poids et le développement de l'EAE selon un score clinique décrit dans cette saisine. Les animaux atteignant une perte de poids de 25% par rapport à leur poids initial seront euthanasiés, ainsi que les animaux montrant une paralysie sévère. Les souris sont hébergées par 5 et ont à disposition de l'enrichissement paperwool.

Tous les animaux traités avec la thérapie cellulaire et ceux des groupes contrôles seront analysés afin d'en obtenir un maximum d'information post mortem, au niveau anatomopathologique pour les lésions dans la moelle épinière, et par immunohistologie et cytométrie en flux pour étudier l'infiltration des cellules injectées dans les tissus inflammés.

15727 Toutes les cellules ont mis au point des mécanismes qui leur permettent de percevoir des signaux internes ou provenant de leur environnement et d'y apporter une réponse appropriée. La réponse cellulaire à un signal extérieur dépend de la fixation de ce signal à des récepteurs. Chaque signal agit de manière spécifique sur des cellules cibles. Cette spécificité d'action est due à la présence dans chaque cellule de récepteurs capables de reconnaître et de fixer ces signaux. Ces signaux agissent soit directement au niveau de récepteurs intracellulaires soit au niveau de récepteurs membranaires lorsque leur taille et leur nature chimique ne permettent pas leur diffusion à travers la membrane de la cellule, Dans ce second cas, cette fixation déclenche une cascade de réactions aboutissant à la réponse cellulaire. Cette cascade d'événements inclut très souvent la modulation de la concentration intracellulaire de molécules intermédiaires appelées messagers secondaires.

La pharmacocinétique étudie le devenir de la molécule dans l'organisme c'est à dire son absorption, sa distribution par la circulation sanguine, son métabolisme, son élimination. Le but de ce projet est d'obtenir des premières informations concernant les caractéristiques pharmacocinétiques des composés impliqués dans la régulation de messagers secondaires après une administration intraveineuse (voie de référence) sur 4 chiens d'un mélange de ces 4 composés destinés à être administré à l'homme. Aucune méthode alternative ne permettant actuellement de reproduire les effets de l'organisme entier sur les molécules, il est indispensable de recourir à l'animal de laboratoire. L'utilisation des chiens est bien décrite et caractérisée dans la littérature et leur utilisation est conseillée (OECD) pour les essais de produits pharmaceutiques, cette espèce a donc été choisie.

Après l'administration intraveineuse de ce mélange à une dose prédéfinie via un cathéter placé au niveau d'un membre antérieur, des prélèvements sanguins (8 par animal) seront réalisés sur une période de 24h par ponction avec une aiguille à la veine jugulaire. Le sang sera ensuite centrifugé

et le plasma récupéré et analysé afin de déterminer la concentration des molécules. Le volume prélevé de sang sera réduit au minimum et les prélèvements seront effectués alternativement sur les deux jugulaires

Des prélèvements du liquide baignant le cerveau et la moelle épinière (liquide cébrospinal.) seront également réalisés par ponction intervertébrale sous anesthésie générale sur 2 premiers chiens 2 heures après traitement et sur les deux autres 24h après afin d'évaluer si ces molécules peuvent passer dans ce liquide et donc avoir un effet potentiel sur le système nerveux central.

Toute intervention sur l'animal sera effectuée par une personne habilitée et expérimentée afin de réduire au minimum le stress.

Durant toute la phase expérimentale, les animaux seront hébergés par groupe et un enrichissement du milieu adapté sera mis en place pour éviter l'ennui : présence de jouets, de tablettes.

Un suivi des animaux plusieurs fois par jours sera mis en place permettant l'observation générale des animaux et la détection précoce d'éventuels effets du produit sur l'animal.

15728 Les maladies psychiatriques comme la dépression ou les troubles de la personnalité touchent une partie de plus en plus importante de la population. Malgré son origine multifactorielle, l'environnement joue un rôle majeur dans le développement, le déclenchement et/ou l'évolution de ces troubles. Ainsi, les événements dits traumatiques pendant l'enfance font très souvent partie de l'histoire clinique des patients psychiatriques. Par contre, les effets 'protecteurs' de l'environnement familial n'ont jamais été étudiés. Dans ce projet, nous cherchons à évaluer, chez la souris, comment la modification du niveau de soins maternels pendant la période précoce de la vie post-natale influence la susceptibilité au stress à l'âge adulte. Pour aborder cette problématique et comprendre les changements moléculaires et des connexions neuronales induits par l'environnement social, nous allons étudier 3 groupes de souris exposés à des niveaux de soins différents pendant les 14 premiers jours après la naissance. À l'âge adulte, ces souris seront soumises à un stress social intense (défaite sociale) ou à un protocole de stress non-prévisible. Les conséquences comportementales et moléculaires seront ensuite comparées. Ces connaissances seront d'une grande utilité pour approfondir nos connaissances sur l'origine des maladies psychiatriques.

REMPACER : Ce type d'étude nécessite un modèle animal puisque les méthodes de remplacement (e.g. culture cellulaire) ne permettent pas d'évaluer les fonctions cérébrales supérieures (donc inutilisables chez l'humain). D'une manière générale les modèles rongeurs sont nécessaires en neurosciences intégratives pour des raisons de proximité de comportements basiques avec l'Homme ainsi que par les aspects logistiques (reproduction, petite taille, transgénèse).

REDUIRE : Nous allons limiter au maximum le nombre d'individus à utiliser pour ce projet. Le fait d'utiliser un modèle physiologique (facteurs environnementaux) évitera la génération de nouvelles souches transgéniques présentant des anomalies/handicaps. Nos données préalables nous ont également permis un calcul approximatif de la taille de la cohorte optimale pour ces expériences permettant de limiter le nombre d'animaux sans diminuer pour autant la puissance de nos analyses. Le nombre total d'animaux à utiliser dans ce projet est estimé à 411 souris.

RAFFINER : De nombreuses mesures seront prises pour éviter toute sorte de souffrance et respecter le bien-être des animaux. Les prémédication, anesthésie, analgésie, suivi et soins post-opératoires se feront systématiquement selon des procédures validées par le vétérinaire. Pour les chirurgies, nous utiliserons une anesthésie locale aux points d'ouverture de la peau en plus d'une anesthésie générale. Une échelle de bien-être permettra d'évaluer et pallier une éventuelle souffrance chez un animal.

15729 L'information génétique nécessaire au bon fonctionnement des organismes vivants est contenue dans la molécule d'ADN. Or l'ADN fait constamment l'objet de dommages introduits soit secondairement à des fonctions physiologiques, telle que la recombinaison V(D)J des gènes d'immunoglobuline, soit à la suite d'exposition à des agents génotoxiques de l'environnement tels que les rayonnements. Ces dommages sont très efficacement réparés pour éviter l'altération de

l'intégrité du génome. Les défauts de réparation de l'ADN, notamment dans certaines maladies génétiques, conduisent à diverses pathologies telles que la neurodégénération, les déficits immunitaires ou les cancers.

Nous générons des modèles murins d'altération des processus de réparation de l'ADN afin de mieux comprendre le développement normal du système nerveux central et du système immunitaire, d'apprécier les conséquences du défaut de ces processus dans certaines maladies génétiques et dans le développement des cancers afin d'entrevoir de nouvelles solutions thérapeutiques pour ces maladies.

Le développement du système nerveux central et du système immunitaire repose sur des procédés complexes pour lesquels il n'existe malheureusement pas de modèles cellulaires *in vitro* permettant une vision globale. Les souris de laboratoires constituent des modèles particulièrement bien étudiés de ces fonctions. Nous générons ainsi des modèles de souris par l'introduction de mutations dans les gènes codant pour des facteurs impliqués dans les voies de réparation de l'ADN pour faire une étude phénotypique sans intervention. Les phénotypes observés sont en général assez homogènes, ce qui permet une réduction du nombre d'animaux à étudier. L'obtention, à partir de ces animaux, de lignées cellulaires immortalisées *in vitro* permettra d'en réduire le nombre.

Dans les formes les plus sévères, les altérations des mécanismes de réparation de l'ADN se traduisent par une létalité embryonnaire des animaux homozygotes. L'analyse des embryons au dernier tiers de gestation permettra d'appréhender le rôle de ces facteurs.

Dans d'autres cas, les animaux sont viables mais présentent des déficits immunitaires. Ils sont alors particulièrement sensibles aux infections par des agents pathogènes et nous prévoyons donc un raffinement en zone protégée pour éviter leur exposition à ces agents. Les parents, porteurs hétérozygotes des anomalies génétiques introduites, ne présentent en général aucun déficit et se comportent comme des animaux sains.

Nous avons créé par la méthode de CRISPR/Cas9, 5 modèles de souris mutées dans des voies de réparation de l'ADN. Le présent projet vise à évaluer le caractère dommageable de ces mutations sur la viabilité des animaux et leur compétence immunitaire. Il nécessite, tout modèle confondu, l'analyse d'un maximum de 821 animaux (pouvant être revu à la baisse en cours d'expérience) pour satisfaire aux règles statistiques. Compte tenu des différents croisements il s'étend sur 4 ans.

Nos études devraient permettre une meilleure compréhension des mécanismes liés au développement des cancers dans la mesure où ceux-ci sont assez largement associés à des dysfonctionnement de la réparation de l'ADN et de la recombinaison V(D)J (ex mutations de BRCA2 et cancer du sein).

15730 Les glioblastomes multiformes de grade IV (GBM) sont des tumeurs astrocytaires malignes très invasives, particulièrement résistantes aux thérapies actuelles. La médiane de survie des patients reste très faible (de l'ordre de 15 à 18 mois). Les traitements actuels (exérèse chirurgicale associée à la radiothérapie et une chimiothérapie adjuvante utilisant le témozolomide (TMZ) donnent des résultats cliniques faibles. Il est urgent de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques et d'identifier de nouveaux marqueurs prédictifs et pronostiques de la réponse aux traitements pour améliorer le devenir de ces patients.

Les protéines IAP (Inhibitors of Apoptosis Proteins) sont fréquemment surexprimées dans les cancers. Ces protéines ont la capacité à lier et à inactiver certaines caspases, ce qui conduit à une inhibition de la mort cellulaire. Ces protéines sont donc particulièrement intéressantes en tant que cibles thérapeutiques pour des thérapies anti-cancéreuses.

De récents travaux ont démontré que les cellules de GBM expriment la plupart des membres de la famille des IAP, et en particulier la protéine ML-IAP. De façon intéressante, une étude sur des coupes de GBM issues d'une cohorte de patients atteints de GBM a démontré qu'une forte expression de ML-IAP est significativement corrélée à un mauvais pronostic et à une diminution significative de la survie des patients. De plus, *in vitro*, une inhibition de l'expression de ML-IAP dans des cellules de GBM induit une diminution de leurs capacités prolifératives et invasives. Par

ailleurs lorsque des cellules de GBM sont traitées avec le GDC-0152, un inhibiteur de ML-IAP, nous observons un effet cytotoxique et antimigratoire moins important lorsque ML-IAP est sous-exprimée. Afin de confirmer la valeur prédictive de l'expression de ML-IAP dans l'efficacité du GDC-0152 *in vivo* dans la progression du GBM, nous grefferons localement (voie orthotopique intracrânienne) des cellules de GBM normales ou sous-exprimant ML-IAP dans un modèle de souris C57Bl/6, puis les animaux seront traités avec le GDC-0152 (injections intraveineuses). Nous évaluerons alors l'efficacité du traitement sur les animaux porteurs de tumeurs de GBM sous-exprimant ML-IAP ou non, en suivant la progression de la pathologie dans les différents groupes en mesurant le poids des animaux tous les jours et en observant tout changement dans leur comportement ou l'apparition de signes cliniques. L'évolution des volumes tumoraux au cours du temps et l'expression de certains marqueurs histologiques seront analysées après dissection des cerveaux.

Dans le souci du respect de la règle des 3R, une anesthésie durant la chirurgie et une analgésie post-opératoire seront mises en œuvre. La détection de toute souffrance de l'animal sera assurée et le niveau de souffrance évalué en fonction d'une grille de score. Les animaux seront euthanasiés dès l'apparition d'un signe de détresse (perte de poids supérieure ou égale à 20% du poids initial, posture, prostration, difficultés à respirer, à se déplacer, ataxie). Pour le bien-être de l'animal, les souris seront logées selon les normes requises avec un enrichissement (copeaux de bois, dômes) et en groupes de 5 individus par cage afin d'éviter le stress de l'isolement. Afin de réduire au minimum le nombre d'animaux utilisés, un maximum d'expériences sera réalisé *in vitro*. Le nombre d'animaux prévu dans chaque groupe est basé sur un calcul d'effectif permettant de prédire que nous avons 80% de chance d'obtenir un résultat statistiquement significatif. Cette étude de validation *in vivo* est indispensable avant toute évaluation clinique chez le patient. Il n'existe à l'heure actuelle, aucune autre méthode qui pourrait se substituer à l'expérimentation animale dans ce domaine. Au total, un maximum de 198 souris est prévu pour la globalité de l'étude.

15731 Lors du développement de solutions thérapeutiques chimiques ou biologiques, la détermination précoce de l'exposition à un produit d'intérêt chez l'animal permet d'objectiver les étapes de résorption, de métabolisme, de distribution et d'élimination de substances actives et d'identifier précocement un risque pour la sécurité de l'homme.

Le projet s'inscrit donc dans une stratégie globale de caractérisation de nouveaux composés en vue de la première administration chez l'homme. C'est donc une étape clé dans le cycle de vie de tout médicament en développement.

Ces évaluations ont tendance à être réalisées très en amont au niveau des étapes de recherche sur des molécules d'intérêt à forts potentiels.

La conduite des procédures évaluant l'exposition de l'animal est nécessaire afin d'objectiver les étapes d'absorption, de distribution, de métabolisme, et d'excrétion dans les différents organes afin de prédire le comportement de ces mêmes molécules d'intérêt chez l'homme.

Mise en œuvre des 3Rs :

Remplacement : De nombreux tests *in vitro* existent et permettent de sélectionner les molécules d'intérêt uniquement sur la base d'une de leurs caractéristiques pharmacocinétiques, notamment l'absorption et le métabolisme. Aucune méthode évitant totalement le recours à l'animal n'est développée à ce jour pour déterminer l'ensemble des propriétés pharmacocinétiques d'un composé d'intérêt a fortiori chez l'homme.

Réduction : Le recours à des tests de sélection *in vitro*, la simulation ou la modélisation des étapes d'absorption réduit fortement le nombre de molécules d'intérêt à tester. La mise en œuvre techniques de prélèvements de volumes réduits de liquides biologiques autorisant la réalisation de prélèvements répétés sur un même animal et la forte sensibilité des méthodes d'analyses des composés permettent de réduire le nombre d'animaux. Le recours à des procédures chirurgicales d'implantation à demeure de cathéter autorise des prélèvements sériés de faibles volumes sur un même animal et contribue également à la réduction du nombre d'animaux sur ce projet.

Raffinement : Le raffinement des plans expérimentaux des études pharmacocinétiques repose sur une optimisation du nombre de temps de prélèvements afin de limiter le volume de sang total

prélevé. Pour garantir le bien-être de l'animal, les animaux peuvent être suppléés par l'administration de sérum physiologique. Les animaux sont hébergés en groupe dans des cages contenant des dispositifs d'enrichissement, dans des locaux appropriés, conformes aux standards réglementaires et suivis par un personnel spécifiquement formé et compétent. A chaque fois que cela est possible, des points limites ou des protocoles de prise en charge de la douleur sont mis en place dans les études pour limiter la souffrance des animaux.

Le projet est mis en œuvre par du personnel qualifié et habilité conformément à la réglementation en vigueur. De plus, les procédures sont fortement améliorées grâce à l'organisation de formations complémentaires pour le personnel en relation directe avec les animaux sur les techniques d'administration et de prélèvements de liquides biologiques et d'organes.

Le projet nécessitera de recourir à environ 55 000 rongeurs (souris, rats, hamsters, gerbilles) et lapins sur cinq ans.

15732 Ce projet s'inscrit dans le cadre d'un programme de recherche destiné à identifier de nouvelles molécules permettant de traiter la fibrose et l'insuffisance hépatique dans le cadre de maladies cholestatiques chroniques, telles que la cholangite biliaire primitive (CBP) et la cholangite sclérosante primitive (PSC).

La cholestase est définie par un défaut de transport des acides biliaires du foie vers l'intestin.

Quelle qu'en soit l'étiologie (lithiase biliaire, tumeur, kyste, infectieuse, ...), une cholestase chronique, du fait de l'accumulation d'acides biliaires toxiques entraîne le développement d'une fibrose hépatique voire d'une cirrhose et de ses complications.

Les cholestases ont des fréquences relativement différentes, compte tenu de leurs hétérogénéités, la lithiase vésiculaire à elle seule touche 20 % de la population occidentale, la cholangite biliaire primitive 20 cas pour 100 000 (si l'on considère la population féminine après 40 ans, la fréquence atteint 1 cas sur 1000) et seulement 1/100 000 pour ce qui est de la cholangite sclérosante primitive.

Dans les cas des Cholangites biliaires primitives et des cholangites sclérosantes primitives, il s'agit de maladies chroniques, qui dans un premier temps sont relativement asymptomatiques (légère perte de poids, gêne abdominale, fatigue ...), elles aboutissent à une augmentation du volume de la rate, jaunisse et peuvent évoluer en l'absence de traitement à une cirrhose et à un cholangiocarcinome chez environ 8 % des patients. La transplantation hépatique reste alors le seul traitement efficace au stade terminal de la maladie, bien que certains traitements (l'acide ursodésoxycholique) à fortes doses puissent améliorer les symptômes des patients avec cependant certains effets secondaires (douleurs gastro-intestinales, diarrhées,).

Des nouveaux agents anti-cholestatiques font l'objet d'une évaluation préclinique mais aucun à ce jour n'a reçu d'autorisation de mise sur le marché.

Afin d'étudier et d'étayer nos hypothèses lors du développement de nos molécules, il nous sera inévitable d'avoir recours à des modèles animaux mimant au mieux la pathologie humaine puisqu'actuellement aucune méthode alternative n'est disponible pour évaluer l'efficacité des molécules candidates

Ainsi, nous nous proposons de poursuivre l'évaluation de molécules sur deux modèles de cholestase déjà étudiées au sein de nos laboratoires. Ces deux modèles sont induits par des régimes spéciaux 2. 3,5-diéthoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine (DDC) et l'acide lithocholique (LCA), ils conduisent tous les deux à une obstruction des voies biliaires mimant ainsi la pathologie cholestatique.

Les procédures expérimentales utilisées dans ce projet sont de classe modérée et seront réalisées dans les conditions les moins stressantes possibles pour les animaux.

Les molécules étudiées dans le cadre de ce projet auront toutes été préalablement expérimentées sur des modèles *in vitro* contribuant ainsi à l'utilisation de méthodes alternatives visant à remplacer partiellement l'utilisation des animaux comme nous le rappelle la règle des 3 R's.

Seules les molécules ayant eu une efficacité feront l'objet d'une évaluation chez l'animal.

De plus, il ne sera effectué sur les animaux que le nombre strict de prélèvements sanguins, en volume et en fréquence, compatibles avec la physiologie de l'animal.

Les animaux seront sous observation quotidienne et aucun animal en détresse ou en souffrance ne sera maintenu dans cet état, il serait euthanasié par une méthode humaine adaptée le cas échéant. Par ailleurs, l'hébergement des animaux pendant la phase d'acclimatation et pendant l'expérimentation sera faite avec enrichissement du milieu afin d'améliorer leur bien-être.

A terme, nos travaux pourraient ouvrir de nouvelles voies de traitement de certaines formes de maladies hépatiques chroniques, aujourd'hui ce besoin médical est clairement établi. Ce projet engagera des souris et dans un nombre estimé à 1780 individus pour la durée que couvrira ce projet. Le nombre d'animaux utilisé dans chaque lot de chaque procédure est réduit, il correspond au seuil minimal qui puisse nous permettre d'apprécier, avec nos moyens techniques et en fonction de la variabilité inter individus, les effets désirés.

15733 La fibrose hépatique se définit par l'apparition dans le foie d'un réseau de plus en plus dense de fibres de collagènes qui vont peu à peu remplacer le tissu hépatique. La fibrose se développe à la suite d'agressions répétées ou continues du foie et peut conduire au développement d'une cirrhose. A l'heure actuelle, aucun médicament disponible ne bloque la formation de fibrose efficacement et en toute sécurité.

Toutefois de nouveaux médicaments sont en développement. Leur objectif est principalement de bloquer l'apparition de la fibrose par une action sur les cellules responsables du dépôt de fibrose les cellules stellaires. En conditions non pathologiques, le rôle physiologique des cellules stellaires hépatique est de stocker la vitamine A. Mais en cas d'agression du foie (alcool HVB HVC ...), les lésions hépatocytaires dû à l'agression entraîne la libération de médiateurs qui vont activer les cellules stellaires. Cette activation va induire leur prolifération et leur transformation en myofibroblastes dont les caractéristiques phénotypiques sont l'acquisition de capacités contractiles et de production de collagène.

Dans un premier temps et de manière générale, l'évaluation de nouveaux traitements antifibrosants est effectuée par des expérimentations en culture cellulaire. Dans le cadre des expérimentations sur des cellules stellaires, la majorité des études utilisent des cellules de souche LX1 et LX2. Ces cellules cancéreuses ont été immortalisées. Elles présentent un certain nombre de changements chromosomiques qui a conduit à des modifications fonctionnelles par rapport à des cellules saines primaires. Ces changements phénotypiques et fonctionnels apparaissent plus ou moins de façon importante comparée à des cellules primaires. Mais ils impactent directement les cibles thérapeutiques des traitements potentiels. De ce fait l'expression du caractère immortel de ces cellules rendent difficile l'évaluation d'efficacité thérapeutique, de traitements visant à induire la mort cellulaire. De plus, les conséquences de l'ensemble des modifications chromosomiques n'ont pu être identifiées. En conséquence, il est difficile d'imaginer que tous les mécanismes de régulation de la cellule immortalisée soient normalement préservés par rapport à des cellules saines même activées. C'est pourquoi il est de plus en plus exigé de tester les traitements ayant pour cible thérapeutique les cellules stellaires sur des cellules issues de tissus hépatique frais. Cette approche méthodologique nécessite des techniques d'extractions cellulaires basées sur une digestion enzymatique des tissus à partir de foie prélevé sur des animaux. Cependant, ces techniques *in vitro*, ont un rendement d'extraction cellulaire assez faible et nécessite souvent le sacrifice de plusieurs animaux pour obtenir un pool de cellules suffisant à la réalisation des expérimentations de culture cellulaire. Une technique récemment publiée, permet d'augmenter les rendements d'extraction à partir d'une digestion *In situ* du foie. Cette technique plus rapide, apparaît donc moins coûteuse en animal. Notre équipe, spécialisée dans la recherche préclinique de traitement de la fibrose peut disposer de 5 molécules potentiellement actives au niveau des cellules stellaires. Nous souhaitons donc évaluer ces traitements potentiels sur des cellules stellaires primaires. Afin d'avoir une réelle évaluation thérapeutique, la mise en place et la maîtrise de la technique d'extraction de cellules stellaires hépatiques *In situ* à partir de foie de souris apparaît capitale.

Après extraction *In situ*, le pool de cellules obtenues nous permettra de réaliser l'évaluation thérapeutique de ces traitements par la réalisation d'un ensemble des expérimentations en culture

cellulaires. L'efficacité thérapeutique de traitement sera évaluée à partir les effets de ces molécules sur la survie cellulaire, les mécanismes d'apoptose et de prolifération cellulaire mais également de la capacité de ces molécules à moduler l'activation de ces cellules ou leur capacité à produire les constituant de la fibrose. Afin de déterminer l'efficacité thérapeutique et les mécanismes sous-jacents des traitements testés, nous avons établi à un nombre de 26 souris par traitement. Ce nombre sera suffisant pour obtenir des cellules stellaires pour l'ensemble des expérimentations et à une analyse multi variée des différents paramètres observés. Nous prévoyons un stock de souris de remplacement correspondant à 15 % du nombre de souris nécessaires à la réalisation des expérimentations.

Les conditions d'élevage, d'hébergement, seront les plus appropriées à réduire au maximum toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage physique aux animaux. Les animaux seront soumis à une surveillance quotidienne au cours de laquelle l'intégrité physique et comportementale, la prise alimentaire seront évalués sur la réalisation d'un score clinique. L'apparition de douleur ou d'atteinte de l'intégrité physique de l'animal engendrera une prise en charge de la douleur (anesthésiants, analgésique), la mise en place de soins ou une sortie de l'animal de l'expérimentation. Lors de l'extraction les animaux seront anesthésiés et analgésiés. Par ailleurs, une quinzaine de souris pour l'apprentissage de la technique d'extraction des cellules stellaires seront nécessaires. Soit 165 souris sur cinq ans. Cette technique nous permettra d'augmenter les connaissances mécanistiques de la fibrose et d'améliorer la performance thérapeutique des maladies hépatiques, chez l'homme.

15734 Il existe des surdités profondes héréditaires causées par une mutation génétique. Il n'existe aucun traitement curatif des surdités non syndromiques autosomiques récessives, seulement une possibilité d'implantation cochléaire dont l'efficacité est partielle. Certaines de ces surdités pourraient être corrigées par thérapie génique (par injection d'un vecteur porteur du gène déficient). Les premiers résultats chez la souris, bien que très encourageants, ne permettent pas d'envisager immédiatement des essais chez l'Homme (essais cliniques) : certaines caractéristiques du modèle murin comme la taille et le développement de l'oreille interne ainsi que les fonctions des gènes chez la souris diffèrent significativement de ceux des humains. De par des travaux antérieurs, le modèle primate non-humain apparaît comme le plus adapté pour l'étude des pathologies auditives. En plus des correspondances anatomiques et fonctionnelles, le modèle de primate non-humain permet aussi de tester la faisabilité d'une injection locale équivalente à celle qui serait pratiquée chez l'Homme. Certains aspects portant sur l'administration par voie chirurgicale, et la technique de prélèvement et d'histologie de l'os cible (l'os temporal) ont déjà été validés à l'aide de tests ex vivo. Le but de ce projet est de valider la qualité de transduction du vecteur viral chez le primate non-humain et d'évaluer son impact sur la fonction auditive.

Le recours à l'animal est nécessaire car aucune méthode alternative qui reproduise les caractéristiques fonctionnelles de l'ouïe n'existe actuellement. Il faut donc recourir à un modèle animal dont les caractéristiques anatomiques et fonctionnelles de l'ouïe sont les plus proches de celles chez l'Homme pour tester et optimiser la spécificité et la sécurité des vecteurs qui ont donné des résultats prometteurs dans le modèle murin.

Il sera fait appel à des techniques électrophysiologiques (potentiels évoqués auditifs ou PEA) et à l'histologie de prélèvements des os temporaux. Les PEA permettent d'obtenir le seuil auditif des animaux de façon non-invasive.

L'ensemble des travaux du projet nécessitera un total de 24 macaques cynomolgus, nés et élevés en captivité dans des établissements autorisés.

Le nombre de primates a été réduit au minimum nécessaire pour garantir la validité statistique des résultats.

Toutes les interventions de chirurgie et d'imagerie sur les animaux sont similaires à celles qui seront pratiquées sur l'homme et se feront sous anesthésie générale, renforcées si nécessaire par des compléments analgésiques et anti-inflammatoires appropriés. les paramètres vitaux seront surveillés et maintenus au cours de la chirurgie (perfusion, tapis chauffant, etc...)

La mise en oeuvre d'un suivi dans le temps non invasif (comme par exemple les tests électrophysiologiques sur animaux anesthésiés) permet de diminuer le nombre d'animaux utilisés ainsi que la contrainte qui leur est imposée. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions et des critères de points limites ont été prévus pour prendre en compte des effets inattendus. Si tel était le cas, le vétérinaire serait alerté afin de mettre en oeuvre des traitements appropriés. Les animaux seront au minimum par paire et un programme d'enrichissement adapté sera mis en place tout au long de l'étude.

15735 Au cours de la maladie d'Alzheimer (MA), des pertes de synapses et de neurones se produisent dans des régions particulières du cerveau. Ces pertes seraient à l'origine des troubles cognitifs caractérisant cette maladie. De telles pertes sont également observées dans des souris transgéniques chez lesquelles ont été introduites des mutations responsables de formes familiales de la MA. Nos résultats indiquent que chez ces souris, les pertes de synapses et de neurones sont précédées par une augmentation de la quantité de récepteurs métabotropiques au glutamate de type 5 (mGluR5s). Notre projet vise à étudier le rôle de mGluR5 dans les pertes de synapses et de neurones. Les neurones des patients atteints de MA et ceux des souris transgéniques modèles de MA présentent également une inactivation du facteur "eukaryotic translation initiation factor 2 subunit alpha" (eIF2 α), qui permet normalement la synthèse protéique. Comme mGluR5 peut entraîner une inhibition d'eIF2 α , nous déterminerons également si mGluR5 exerce ses effets en contrôlant l'activité d'eIF2 α . Nous avons aussi observé chez les souris transgéniques une réduction du nombre de lysosomes, qui servent à dégrader les composants cellulaires altérés afin de recycler leurs constituants. Nous avons également observé une accumulation anormale de protéines (Amyloïde β , A β) et de lipides (GM2, cholestérol) non dégradés dans les lysosomes. Nous étudierons donc aussi le rôle des altérations des lysosomes dans les pertes de synapses et de neurones. Enfin nous avons montré que la perte de synapses est précédée par un changement de forme des synapses, qui pourrait altérer leur fonctionnement et leur maintien. Comme la forme des synapses est contrôlée par le calcium, nous étudierons les niveaux de calcium et leur régulation au niveau des synapses individuelles.

Notre étude devrait permettre de déterminer si l'augmentation précoce de mGluR5, l'inactivation d'eIF2 α ou l'altération des lysosomes sont responsables de la perte progressive de synapses et de neurones dans un modèle murin de MA. L'implication d'une de ces modifications ouvrirait des perspectives thérapeutiques pour la pathologie humaine.

Nous utiliserons un total de 240 souris. La règle des 3R sera appliquée 1) remplacer, les études permettant de répondre aux questions posées ne peuvent être réalisées que sur des souris transgéniques, mimant les lésions de la MA 2) réduire, le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum pour nous permettre de générer des données reproductibles et donc solides 3) raffiner, les méthodes sont choisies pour réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et l'angoisse (i) les souris ont à disposition, comme élément d'enrichissement, des composants de nidification (ii) une surveillance quotidienne des paramètres environnementaux (lumière, température, hygrométrie, pH de l'eau) et des animaux (pelage, comportement, locomotion, etc) est effectuée, afin de détecter un état de stress ou de douleur nécessitant un traitement, ou la mise en place d'une procédure d'euthanasie (iii) les chirurgies sont réalisées dans les conditions usuelles d'anesthésie-analgésie, avec un traitement analgésique post-opératoire.

15736 L'addiction est une pathologie cérébrale associée à des troubles comportementaux, recherche compulsive de drogues et dépendance. Les addictions reposent sur des changements durables des propriétés neuronales au sein de réseaux cérébraux appelés circuits de la récompense. Ce projet vise à identifier les mécanismes cellulaires et moléculaires induits par des expositions aiguës ou chroniques à la cocaïne chez des souris sauvages ou génétiquement modifiées et à établir leur(s) rôle(s) dans les réponses comportementales induites par cette substance addictive.

Au sein des circuits neuronaux de la récompense, le striatum est une structure clé qui intègre des signaux véhiculés par la dopamine (DA) qui sont relatifs à la récompense et le glutamate (Glu) qui codent pour des signaux liés au contexte environnemental et à l'état émotionnel d'un individu. Nos

résultats préliminaires montrent que l'interaction physique (i.e hétéromérisation) entre les récepteurs de la DA (DAR) et du Glu de type NMDA (NMDAR) contrôlent l'activation de cascades de signalisation intracellulaires induite par la cocaïne, notamment la signalisation calcique au noyau, dont le rôle dans la mise en place des addictions reste inconnu à ce jour.

En aval des récepteurs et des voies de signalisation il est maintenant bien établi que les altérations comportementales déclenchées par la cocaïne résultent de remaniements géniques au niveau des circuits de la récompense. Parmi ces remaniements, une attention particulière sera portée sur l'épigénétique, qui permet de modifier de façon durable l'expression d'une catégorie de gènes. Dans ce cadre, nous étudions les micro-ARNs (miARNs), de petits ARN non-codants qui inhibent l'expression des ARNm.

Nous avons développé des études approches virales pour bloquer de manière contrôlée dans le temps la formation des hétéromères DAR/NMDAR au sein des circuits de récompenses mais aussi pour bloquer la signalisation calcique au noyau ou encore modifier les taux de miRNA dont le niveau d'expression est régulé par cocaïne. Nous testerons chacune de ces approches sur les changements moléculaires, morphologiques induites par la cocaïne ainsi que sur chaque phase des réponses comportementales induites par cette drogue (escalade, extinction et rechute). Enfin, grâce à l'aide de vecteurs viraux permettant d'exprimer des marqueurs fluorescents stables lorsque l'activité neuronale est accrue, nous visualiserons les réseaux neuronaux activés lors d'expositions aiguës ou répétées à la cocaïne et testerons l'effet du blocage des hétéromères D1R/NMDAR, de la signalisation calcique au noyau, et des taux de miRNA sur le recrutement de ces réseaux en réponse à la cocaïne.

Notre objectif est donc de progresser dans la compréhension des bases moléculaires de l'addiction. Il présente un fort potentiel dans l'identification de bio-marqueurs, de nouvelles cibles pharmacologiques et de facteurs de risque dans le but ultime de développer des approches thérapeutiques chez les patients dépendants à la cocaïne. En raison des variabilités individuelles inhérentes aux tests comportementaux envisagés, le nombre total de souris nécessaires à la réalisation de ce projet est de 1608. Pour toutes ces études, la règle des 3R sera scrupuleusement respectée. Pour le remplacement des études *in vitro* sur cultures de cellules neuronales sont utilisées dès que possible afin de tester les doses et conditions optimales d'utilisation de nos outils viraux et de tester leurs effets au niveau moléculaires. Pour le raffinement, les animaux seront hébergés avec un cycle jour/nuit adapté et avec la boisson et la nourriture ad libitum. Les cages sont enrichies par du nid. Les souris feront l'objet d'un contrôle au moins quotidiennement par une personne compétente. Ces contrôles doivent permettre de repérer tout animal malade ou blessé et de prendre les mesures appropriées, ou de retirer des salles d'hébergement les animaux morts. Ces contrôles seront enregistrés. Des méthodes seront mises en place pour réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux (injection d'antalgiques ou bien mise à mort par injection d'une surdose d'anesthésique). Pour la réduction, l'analyse statistique des études comportementales sera optimisée afin de réduire le nombre d'animaux utilisés pour chaque expérimentation. Les cohortes ont été mises en place de façon à réutiliser les mêmes animaux pour plusieurs analyses expérimentales.

15737 Les traitements anticancéreux traditionnels ne détruisent pas spécifiquement les cellules cancéreuses et ne préviennent pas les récives. Nous travaillons sur certaines chimiothérapies (anthracyclines ou oxaliplatine) capables d'activer le système immunitaire et en induisant la mort cellulaire immunogène. Une étude clinique rétrospective a mis en évidence que deux polymorphismes affectants des gènes essentiels à la détection de cellules tumorales mourantes, impliqués dans l'efficacité de la chimiothérapie, sont associés avec une réduction de la survie chez des patientes atteintes de cancer du sein, recevant des anthracyclines. Notre projet vise à déterminer si le ribociclib est un traitement compensatoire des effets provoqués par l'absence de ces gènes et son effet sur le système immunitaire. Cette question ne peut être abordée qu'*in vivo* car il n'est pas possible d'étudier l'implication du système immunitaire sur le contrôle de la croissance tumorale dans des systèmes *in vitro* et ne peut donc pas faire l'objet de remplacement par d'autres techniques. Nous souhaiterons effectuer cette étude sur un total de 960 animaux en

utilisant des souris immunocompétentes (n. 480) et des souris transgéniques (n. 480), qui sont fertiles, de taille normale et ne présentent pas d'anomalies physiques ou comportementales. Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des expérimentations (expériences de croissance tumorale) a été mis au point afin de respecter les exigences de remplacement, réduction et raffinement pour permettre une interprétation fiable des résultats dans le respect du bien-être animal. Les expérimentations seront regroupées au maximum afin de réduire le nombre d'animaux contrôles. L'étude sera arrêtée si la procédure initiale invalide l'hypothèse de travail. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et adaptées en accord avec le personnel de l'animalerie (les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum; le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification et/ou tunnels en cartons). Les animaux seront observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être. La mise en place d'une grille de suivi strict des points limites permettra d'éviter au maximum le stress et/ou la douleur au cours de l'expérimentation. De plus, le personnel impliqué dans ce projet est qualifié sur le plan technique et formé en continu sur les pratiques d'expérimentation animale. Il assure également une veille scientifique continue, évitant toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature.

15738 Nous nous intéressons aux dystrophies musculaires, un groupe hétérogène de maladies génétiques touchant le muscle squelettique. Elles sont caractérisées par une faiblesse musculaire et une dégénérescence progressive des muscles du corps. L'âge d'apparition des symptômes, le nombre de muscles touchés et la gravité de la maladie, peut varier selon la dystrophie musculaire. À l'heure actuelle, il n'existe pas un traitement curatif pour les dystrophies musculaires.

La poïkilodermie congénitale fibrosante (POIKTMP) est une pathologie caractérisée par une atteinte cutanée, constituée par une diminution de la taille des cellules de la peau, une pigmentation anormale de la peau (dyschromie) et des dilatations des vaisseaux sanguins à la surface de la peau (télangiectasies). Récemment une forme particulière de poïkilodermie congénitale fibrosante (POIKTMP), qui associe une atteinte cutanée, des rétractions tendineuses, une atteinte pulmonaire et une atteinte musculaire a été décrite. La mutation et le gène responsable de cette maladie (FAM111B) ont été également publiés récemment.

Ce projet consiste à étudier la mutation de cette nouvelle protéine dans sa forme sauvage et mutée, comme retrouvé dans la POIKTMP. Afin d'étudier *in vivo* l'effet de la mutation de ce gène dans le muscle squelettique nous injectons le muscle Tibialis Anterior (TA) avec un vecteur viral de type AAV (virus adeno-associés, AAV) exprimant soit la forme sauvage de la protéine soit la forme mutée. L'expression de la protéine et son effet sur le muscle squelettique seront évalués à différents temps après injection. Nous utiliserons des souris immunodéficientes : le phénotype « immunodéficient » permet de nous affranchir d'une éventuelle réponse immunitaire contre les AAVs. Ce projet nous permettra d'étudier le rôle de cette protéine dans le muscle squelettique.

Au total, 45 souris immunodéficientes seront utilisées. L'injection des vecteurs de thérapie génique dans l'animal vivant est le seul moyen disponible pour en tester l'efficacité *in vivo*. Pour la réduction, nous utiliserons le nombre minimum de souris nécessaire pour avoir des différences statistiquement significatives entre les groupes de souris. Egalement, afin de réduire le nombre de souris utilisées dans le respect de la règle des 3R, pour chaque souris les deux TA gauche et droite seront injectés. Les souris sont anesthésiées lors de l'injection des vecteurs AAV. Suite au réveil, les animaux seront surveillés quotidiennement pendant toute la durée de l'expérience afin de détecter des signes de douleur

15739 Notre environnement change, il accumule des quantités et des sources croissantes de polluants. Parmi eux, les perturbateurs endocriniens (PE) sont soupçonnés de contribuer à la prévalence et la gravité accrues de nombreuses pathologies dont le diagnostic est établi après plusieurs années d'exposition chronique. Les marqueurs précoces sont ainsi fortement espérés. Les yeux et les dents sont, de par leur accès facile, de bons candidats les yeux étant une fenêtre sur le système nerveux central et l'émail dentaire capable d'enregistrer l'historique de l'exposition aux polluants. De plus, les deux peuvent être altérés par les hormones stéroïdes conduisant à des pathologies de l'émail et de la rétine. La question de l'implication des PE dans ces pathologies sera évoquée ici.

L'objectif du projet est de caractériser les effets de cocktail d'un mélange de 15 PE trouvés dans le liquide amniotique humain qui imite les conditions environnementales, avec ou sans fluorure également signalé récemment pour son activité de PE sur les yeux et les dents. Dans le cadre du projet, des souris seront exposées à un mélange de PE de la vie fœtale à 8 mois après la naissance avec des groupes de souris stimulées par des corticoïdes ou un stress par la lumière bleue pour reproduire des situations humaines pathologiques. Dans l'ensemble, le projet apportera des arguments sur le lien existant, le cas échéant, entre les défauts de l'émail survenant tôt dans la vie et les pathologies oculaires diagnostiquées plus tard afin d'établir des outils de diagnostic prédictifs non invasifs de l'exposition aux PE, techniquement et financièrement faciles à transférer aux conditions humaines. Dans ce projet, nous exploitons les capacités/techniques d'observations des effets des PE sur le long terme grâce à l'étude de deux organes dont l'examen des signes peut se faire sans sacrifice de l'animal, limitant ainsi le nombre d'animaux utilisés. Nous utiliserons au total 3060 souris. Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des expérimentations a été mis au point afin de respecter les exigences de remplacement, réduction et raffinement pour permettre une interprétation fiable des résultats dans le respect du bien-être animal. 1) Remplacer l'impact des PE ne peut être ni modélisé *in silico*, ni prédit à partir des expériences *in vitro* car ces molécules perturbent différents axes endocriniens qui interagissent entre eux. Les effets chroniques des PE à faibles doses et à long terme doivent donc nécessairement être étudiés en population humaine (mais long et peu précis) ou en expérimentation animale modélisant bien leur impact en santé humaine. 2) Réduire chaque analyse est menée avec le plus petit nombre d'animaux possible tout en devant être reproduite pour validation. 3) Raffiner en partageant un même modèle avec différentes équipes pour optimiser l'échantillon biologique.

L'étude sera arrêtée si la procédure initiale invalide l'hypothèse de travail. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et adaptées en accord avec le personnel de l'animalerie (les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum). Les animaux sont observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être. De plus, le personnel impliqué dans ce projet est qualifié sur le plan technique et formé en continu sur les pratiques d'expérimentation animale. Il assure également une veille scientifique continue, évitant toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature. Plusieurs tissus seront prélevés et soumis à diverses analyses (immunologiques, histologiques ou de biologie cellulaire et moléculaire) pour extraire le maximum de données de chaque expérimentation. Ces tissus seront également partagés avec nos collaborateurs dans le but de réduire le nombre d'animaux utilisés. Toutes les procédures chirurgicales seront réalisées sous anesthésie générale et locale et une veille de la douleur sera effectuée au réveil et cette dernière traitée par des antalgiques adaptés.

15740 L'objectif de ce projet est de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la dystrophie myotonique de Steinert (DM1) afin de pouvoir développer et tester de nouvelles approches thérapeutiques. La DM1 touche 1 personne sur 8000 en France. C'est une maladie dominante caractérisée par une grande variabilité dans la nature et la sévérité des symptômes. Elle se caractérise par une faiblesse musculaire, une myotonie, une cataracte précoce, des troubles cardiorespiratoires, une hypersomnolence, un hyperinsulinisme et des anomalies cognitives et du comportement. La forme la plus grave de la maladie se manifeste dès la naissance par une hypotonie, des problèmes respiratoires sévères et des défauts de succion et de déglutition et par un retard psychomoteur et un retard mental. Il n'existe à ce jour aucun traitement efficace de cette maladie.

Afin d'étudier cette maladie au cours du développement et dans différents tissus, nous avons développé un modèle de souris transgéniques porteuses du gène muté responsable de la DM1. Ces souris transgéniques reproduisent certaines caractéristiques de la maladie. Seule l'utilisation de modèles animaux comme la souris nous permet d'étudier les mécanismes à l'origine de la pathologie dans différents tissus et au cours du développement.

Nous utiliserons notre modèle afin d'étudier les mécanismes particuliers liés à la mutation, leurs conséquences physiopathologiques dans le but de mieux comprendre les mécanismes

moléculaires et physiologiques impliqués notamment 1) dans la forme sévère congénitale, 2) dans les anomalies du système nerveux.

La majorité de nos études consiste à utiliser des prélèvements après sacrifice de l'animal selon les procédures standard, réalisées dans le respect de l'éthique animal. D'après nos études antérieures sur le muscle, nous avons pu établir, en prenant en compte la variabilité phénotypique observée dans notre modèle, le nombre minimum de souris à utiliser par lot.

Au total nous utiliserons 479 souris pour l'établissement de cultures de cellules à partir des animaux, pour des études physiologiques non invasives et pour des études *in vitro* postmortem.

Ces animaux seront hébergés tout au long de l'étude dans des cages enrichies à l'aide de coton et d'abris en carton dans un environnement exempt d'organisme pathogène. Afin de réduire la souffrance et le stress des animaux, des points limites ont été établis et un suivi du bien-être des animaux sera réalisé régulièrement.

15741 Le cancer colorectal représente le deuxième type de cancer le plus fréquent en Europe, tant en termes d'incidence que de mortalité. La survie des patients est nettement réduite si les tumeurs sont invasives. Dans le cancer colorectal, de petits groupes de cellules tumorales envahissent localement les tissus environnants, dans un processus appelé " bourgeonnement tumoral ". Les patients ayant un nombre élevé de bourgeons tumoraux ont une survie en moyenne 5 fois plus courte que les patients sans bourgeons. Malheureusement, on sait peu de choses sur la cause du bourgeonnement tumoral.

Le cancer est composé non seulement de cellules tumorales mais aussi d'autres cellules telles que des cellules endothéliales, des fibroblastes et des cellules immunitaires localisées dans des réseaux de macromolécules extracellulaires du tissu conjonctif, l'ensemble étant appelé la matrice extracellulaire. Au fil des ans, notre équipe et d'autres ont démontré que les fibroblastes associés au cancer (CAF) favorisent l'invasion des tumeurs et la formation de métastases. Dans le cancer colorectal, les bourgeons tumoraux sont présents dans les régions riches en CAF. La principale caractéristique des CAF est leur capacité d'utiliser la force pour remodeler la matrice extracellulaire.

Pour tester si les CAFs peuvent induire le bourgeonnement tumoral en exerçant des forces mécaniques, nous avons généré des systèmes *in vitro* 2D et 3D qui consistent en des cellules cancéreuses associées à des CAFs isolées soit de patients atteints de cancer colorectal, soit modèles de souris de cancer intestinal. Nos données préliminaires montrent que les CAFs forment un anneau autour des cellules cancéreuses. En se contractant, les CAFs compriment activement les cellules cancéreuses et génèrent des bourgeons. Le système de modèle *in vitro* s'est avéré précieux, nous permettant de disséquer le mécanisme moléculaire du bourgeonnement. Cependant, il est encore nécessaire de déterminer si les CAF sont capables de générer des bourgeons dans des environnements plus complexes comme ceux que l'on trouve *in vivo*.

La souris est très proche de l'homme génétiquement mais aussi au niveau métabolique et immunitaire, ce qui en fait un excellent modèle pour l'étude de pathologies humaines comme le cancer. Ainsi, pour évaluer si les CAF peuvent induire le bourgeonnement *in vivo*, nous utiliserons des souris transgéniques chez lesquelles nous pourrions inhiber la contractilité des CAF. Chez ces souris, nous allons greffer des cellules tumorales soit par voie sous-cutanée, soit dans la paroi du côlon. Les cellules tumorales seront isolées au préalable du modèle de souris avec des tumeurs intestinales développées spontanément et conservées congelées. La croissance de la tumeur sera suivie chaque semaine par coloscopie (tumeurs orthotopiques) et par mesure de la taille des tumeurs au pied à coulisse (tumeurs sous-cutanées). Après le sacrifice des souris, nous évaluerons l'étendue du bourgeonnement de la tumeur et la présence de métastases.

Cette étude permettra de déterminer si le bourgeonnement de la tumeur est induit par les forces mécaniques exercées par les CAF. Si cela s'avère vrai, cela représenterait un nouveau mécanisme de dissémination des cellules cancéreuses, ouvrant un tout nouveau champ de recherche. Simultanément, ce projet devrait générer de nouveaux marqueurs de pronostic tumoral et des stratégies thérapeutiques potentielles basées sur le ciblage des CAFs.

Notre étude se conforme au principe des 3R

Remplacer les hypothèses quant au bourgeonnement tumoral ont été validées par des approches expérimentales dans des systèmes cellulaires *in vitro*. Cependant, le microenvironnement de la tumeur étant beaucoup plus complexe (il contient en particulier d'autres types de cellules comme les cellules immunitaires et les vaisseaux sanguins), la validation *in vivo* des résultats clés obtenus à l'aide de modèles *in vitro*, est nécessaire afin de tirer des conclusions sur le rôle des fibroblastes dans l'invasion des cellules cancéreuses.

Raffiner Toutes les précautions sont prises pour minimiser la souffrance de l'animal, par exemple anesthésie pendant les interventions chirurgicales, administration d'analgésiques préopératoires et surveillance régulière des souris et mise en place de critères objectifs d'arrêt de l'expérience.

Reduire Le nombre de souris utilisées est ajusté au plus petit nombre compatible avec l'obtention de résultats pertinents. Nous aurons besoin au total de 50 souris sur 5 ans.

15742 Les dégénérescences rétiniennes affectent un nombre croissant de personnes dans une population mondiale qui vie de plus en plus âgées. Ces dégénérescences qui peuvent mener à la cécité représentent un enjeu crucial de santé publique. Il apparaît donc essentiel de trouver des traitements efficaces pour contrer l'évolution de ses maladies et ainsi permettre aux personnes atteintes de conserver leur autonomie dans les tâches de la vie quotidienne.

Dans ce projet, nous proposons de tester l'effet thérapeutique d'un greffon de cellules photoréceptrices issu de cellules souches sur un modèle de dégénérescence rétinienne induit par phototoxicité. Nous utiliserons dans ce projet la souris comme modèle animal car la structure de sa rétine est proche de celle de l'Homme.

Nous administrerons dans l'œil des animaux, une protéine exogène phototoxique par le biais d'outils viraux. Cette protéine entraînera une dégénérescence des cellules de la rétine par illumination de l'œil à une longueur d'onde déterminée. Nous contrôlerons l'efficacité de cette dégénérescence par des techniques d'imagerie *in vivo* non invasive de l'œil. Nous injecterons ensuite à ces animaux des photorécepteurs issus de cellules souches (en sous rétinien). La restauration du tissu rétinien sera également évaluée par des techniques d'imageries non invasives *in vivo* de l'œil.

Au total 156 souris normales seront nécessaires à cette étude.

Nous avons pris soin dans cette étude du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ».

- Ces expérimentations mettant en jeu le tissu rétinien dans son ensemble, l'utilisation de l'animal est indispensable. Il n'y a pas d'alternative par des modèles *in vitro*.

- Le nombre d'animaux a été réduit au minimum pour pouvoir atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus.

- Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Les animaux sont hébergés dans les conditions conformes à la réglementation. Les rongeurs bénéficieront d'une anesthésie générale fixe ou gazeuse et d'une anesthésie locale cornéenne si nécessaire. Une signalétique particulière des animaux en expérimentation est utilisée. Elle permet une observation adaptée des animaux pour s'assurer de leur bien-être.

15743 Les dégénérescences rétiniennes héréditaires telles que la dystrophie bâtonnets-cônes sont une cause majeure de cécité humaine causée par un grand nombre de mutations dans plus de 200 gènes exprimés dans la rétine - dont certains n'ont pas encore été identifiés. L'impact de ses maladies en terme de santé publique est important. Trouver des stratégies pour soigner ses pathologies est un enjeu crucial pour permettre aux personnes atteintes de conserver leur autonomie dans les tâches de la vie quotidienne.

Les dégénérescences rétiniennes ne survenant pas spontanément chez le macaque, il nous apparaît nécessaire de trouver une stratégie pour l'induire afin de pouvoir évaluer l'efficacité d'une thérapie cellulaire par transplantation de photorécepteurs issus de cellules souches dans la reconstruction du tissu rétinien. Une étape préalable par le rongeur est indispensable à ce projet.

Nous proposons ici de créer chez le rat un modèle de dégénérescence rétinienne par pose d'un implant sous-rétinien. La cinétique de la dégénérescence sera observée par des techniques d'imageries de l'œil. Nous utiliserons des implants fixes et biodégradables. Nous testerons dans un second temps, l'efficacité de transplantation de photorécepteurs issus de cellules souches dans la restauration anatomique du tissu rétinien.

Au total, 66 rats seront nécessaires à cette étude.

Nous avons pris soin dans cette étude du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ».

- (Remplacer) Ces expérimentations mettant en jeu le tissu rétinien dans son ensemble, l'utilisation de l'animal est indispensable. Il n'y a pas d'alternative par des modèles *in vitro*.

- (Réduire) Le nombre d'animaux a été réduit au minimum pour pouvoir atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus.

- (Raffiner) Les rats seront examinés quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Les animaux sont hébergés dans les conditions conformes à la réglementation. Les rongeurs bénéficieront d'une anesthésie générale fixe ou gazeuse et d'une anesthésie locale cornéenne si nécessaire. Une signalétique particulière des animaux en expérimentation est utilisée. Elle permet une observation adaptée des animaux pour s'assurer de leur bien-être

15744 La myopathie centronucléaire autosomique dominante est une forme rare de myopathie congénitale due à des mutations du gène DNM2 codant la dynamine 2. Aucun traitement n'est à ce jour disponible et les mécanismes physiopathologiques sont encore largement ignorés. La dynamine 2 est une enzyme impliquée dans les processus de trafic membranaire intracellulaire. Un des objectifs de notre équipe de recherche est de comprendre les mécanismes physiopathologiques de la pathologie et de développer des approches thérapeutiques. Dans ce contexte, un modèle murin exprimant une mutation de la dynamine 2 a été créé en introduisant dans le gène endogène de souris C57BL6 la mutation humaine la plus fréquente changeant l'acide aminé Arginine en position 465 de la protéine par un tryptophane (R465W). Cette lignée de souris KI-Dnm2R465W développe à l'état hétérozygote une faiblesse et une atrophie musculaire progressive dont les premiers signes apparaissent à 1 mois et s'amplifient jusqu'à environ 8 mois avec une perte de force musculaire l'ordre de 40% par rapport à des souris sauvages. Ce phénotype est comparable à celui observé dans la myopathie humaine. Cette lignée de souris développe une myopathie progressive comparable à la pathologie humaine.

Nous avons récemment développé une thérapie par ARN interférence allèle spécifique et réalisé la preuve de principe de cette approche avec une restauration complète des anomalies musculaires dans le modèle de souris lorsque le traitement est administré par l'intermédiaire d'un vecteur viral au début des symptômes. Notre objectif est maintenant de poursuivre le développement préclinique de cette stratégie thérapeutique. Dans cette optique, plusieurs questions seront adressées dans les 5 prochaines années nécessitant l'utilisation d'animaux

- La maintenance sur le long terme de l'efficacité du traitement après une administration dans le muscle et l'efficacité du traitement à un stade intermédiaire de la maladie. Les animaux seront injectés avec un vecteur viral de type AAV (adeno-associated virus) de sérotype 1 permettant une bonne expression musculaire des molécules thérapeutiques.

- L'efficacité du traitement après une administration du traitement via le système sanguin. Les animaux seront injectés avec un vecteur viral de type AAV de sérotype 9 permettant une bonne expression musculaire des molécules thérapeutiques après une injection dans le système sanguin.

- La recherche de moyens d'améliorer l'efficacité du traitement chez les souris plus âgées en améliorant l'entrée du virus dans le muscle (par une augmentation de la dose virale administrée, un changement de sérotype d'AAV, ou un pré-traitement avec de l'ARN interférence).

- L'étude de l'efficacité d'une administration de la molécule thérapeutique en n'utilisant pas de virus (ARN interférence couplé à un transporteur lipidique).

- Le suivi du transport des particules virales dans le muscle malade en utilisant un vecteur viral couplé à un fluorophore.
- Enfin une évaluation des performances musculaires des souris KI-Dnm2R465W sera réalisée dans l'optique d'identifier des paramètres physiopathologiques facilement mesurables pour tester l'efficacité des traitements.

Ce projet est mis en place chez la souris car il s'agit d'une étape indispensable au développement pré-clinique de notre molécule. Le choix du modèle murin KI-Dnm2R465W s'impose car il s'agit de l'unique modèle animal de la myopathie centronucléaire dominante disponible à ce jour. De plus la molécule testée ici pour laquelle la preuve de concept a été réalisée est un outil génétique qui cible spécifiquement la mutation du gène portée par ce modèle.

Nous avons préalablement identifié l'ARNi allèle spécifique efficace dans des cellules en culture et démontré son absence de toxicité sur les cellules. Nous avons par la suite démontré dans un autre projet son innocuité et son efficacité dans le muscle de souris du modèle de la maladie. L'utilisation de vecteurs viraux de type AAV n'entraîne pas de douleurs et donc de mise en place de traitement particulier pour y palier. L'entretien des animaux et les expériences seront réalisés par un personnel titulaire des autorisations et formations nécessaires. Les animaux sont observés quotidiennement par l'animalier en charge de la lignée ou par les personnes en charge des protocoles. Pour tous les projets, des modifications importantes de comportement laissant supposer une douleur excessive (retrait ou vocalisation excessive à la manipulation, prostration ou agitation anormale) seront considérées comme critères d'arrêt et conduira à l'euthanasie des animaux concernés par dislocation cervicale.

Des études précédentes sur nos différents projets ont permis de déterminer le nombre minimum de souris à utiliser afin d'évaluer de façon correcte les paramètres observés (entre 6 à 8 souris par groupes expérimentaux). Les analyses statistiques sur les paramètres mesurés sur ces groupes de petite taille seront réalisées par un test bi-latéral non paramétrique de type Mann-Whitney ou une analyse de variance de type Kruskal-wallis dans les cas où plus de 2 groupes seront comparés.

L'ensemble de ces projets nécessite l'utilisation de 346 souris KI-Dnm2R465W (sauvages et hétérozygotes) pour les 5 ans du projet.

15745 Projet La fibrose hépatique est la conséquence de toutes les maladies chroniques du foie. Elle aboutit inéluctablement à la cirrhose en l'absence de traitement de la cause, voire au carcinome hépatocellulaire.

Il est maintenant établi que les maladies chroniques du foie s'accompagnent d'une angiogenèse (apparition de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux pré-existants) et que cette angiogenèse contribue à la progression de la fibrose. Notre objectif est d'en déterminer les mécanismes, notamment l'implication des myofibroblastes hépatiques. Ce projet fait appel à des expériences *in vitro* qui seront validées à l'aide de tests d'angiogenèse *in vivo* chez la souris.

Les animaux

* Type Souris C57BL/6J, modèle commercial.

* Nombre Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 165 souris expérimentales pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

La conformité au principe des 3R

* Remplacement Un organisme entier est nécessaire pour valider les fonctions angiogéniques des cellules qui font l'objet de ce projet, avec l'analyse de la formation de vaisseaux. Il n'est pas possible de recréer *in vitro* la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs cellulaires rentrant en jeu.

* Réduction Nous limitons au maximum le nombre d'animaux par groupe de façon à obtenir des résultats statistiquement fiables. A cause des variabilités inter-animales et intergroupes, un nombre trop restreint d'animaux engendrerait des résultats trop variables et non valides. Compte tenu des données de la littérature (variabilité attendue) et des effets espérés, un test de puissance statistique a été utilisé pour déterminer le nombre minimum d'animaux nécessaire pour cette étude.

* Raffinement Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures ont été mise au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal, en limitant la douleur et le stress (anesthésie, analgésie, etc.). Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation, les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum. Le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification ou de maison de type igloo. Nous nous efforçons à chaque instant de raffiner nos procédures afin de garantir le bien-être des animaux en cours de procédure grâce à une surveillance attentive (point limite) et des soins adaptés (anesthésie).

15746 Les patchs de couleur chez les animaux forment une catégorie majeure de signaux de communication qui reflètent fréquemment des traits de qualité individuels corrélés avec des facteurs génétiques et/ou avec la condition phénotypique. D'après la théorie en biologie évolutive, la fiabilité de l'information d'un signal de couleur peut être maintenue si un coût significatif est associé à sa production et/ou sa maintenance, par exemple, expliqué par son lien avec la sécrétion d'hormones. En effets, certaines hormones telles que la testostérone jouent un rôle dans le maintien de caractères sexuels secondaires comme la coloration mais leur biosynthèse peut aussi avoir des effets néfastes sur l'organisme, comme une immuno-suppression ou une accélération de la sénescence. L'hypothèse du handicap par immunocompétence propose qu'un signal peut être honnête lorsque son expression dépend de la testostérone puisque cette dernière inflige un coût lié à l'immunocompétence des individus. L'objectif de ce projet est d'étudier la relation entre l'expression des signaux UV au niveau des patchs colorés ventro-latéraux de mâles du lézard des murailles (*Podarcis muralis*) et la sécrétion de testostérone (T) au stade adulte. Dans cette optique, nous utiliserons un total de 60 individus et procéderons à une expérience dans laquelle nous augmenterons (n=20) et bloquerons (n=20) de manière non invasive le taux de T plasmatique de mâles adultes du lézard des murailles capturées en nature par rapport à un lot témoin (n = 20). Pendant 14 journées consécutives pendant la saison de reproduction des lézards, nous appliquerons quotidiennement une solution huileuse de testostérone (T+), d'inhibiteur (T-) ou d'huile placebo (témoins) sur le dos des lézards à l'aide d'une méthode non-invasive. Immédiatement avant et après cette manipulation, nous effectuerons des mesures de morphologie, de couleur et de performance (force de morsure et endurance) afin de détecter d'éventuelles variations à court terme de la qualité et la condition phénotypique dues aux manipulations des taux circulants de testostérone. Nous mesurerons également, avant et après l'expérience, la réponse inflammatoire et le métabolisme basal afin d'établir un éventuel lien entre signaux UV, testostérone et immunité ainsi que dépenses énergétiques. Les lézards seront ensuite relâchés en liberté à l'endroit même où ils ont été capturés 4 semaines auparavant. Les résultats obtenues dans ce projet nous permettront d'améliorer nos connaissances sur la mise en place de signaux UV au cours de l'évolution. Ce projet, complémentaire d'une étude conduite sur le développement de la coloration chez les subadultes et adultes d'une autre espèce de lézard (lézard vivipare *Zootoca vivipara*), nous apportera de précieuses informations nous permettant de mieux comprendre comment les signaux UV varient au cours d'une même saison de reproduction en relation avec la sécrétion de testostérone. Le nombre d'individus utilisé correspond au nombre minimum qui sera suffisant pour mener nos analyses statistiques. Les conditions d'élevage impliqueront un enrichissement des cages et des conditions climatiques correspondant au milieu naturel. De plus, nous avons choisi de développer la méthode la moins invasive possible pour augmenter la testostérone des lézards (i.e. application cutanée) après validation par une étude pilote conduite en 2018 sur le lézard vivipare. Il n'est pas possible de remplacer le modèle biologique de cette étude par un équivalent cellulaire ou *in silico*.

15747 La reproduction chez les caprins a lieu naturellement à l'automne et en hiver (saison sexuelle). Cette saisonnalité conduit à des variations annuelles dans la disponibilité des produits et du prix du lait. La mise à la reproduction hors saison sexuelle est une solution pour maintenir l'offre en lait ou fromage tout au long de l'année (enjeu majeur pour la filière caprine).

Différentes techniques sont disponibles pour maîtriser la saisonnalité de la reproduction. Les traitements hormonaux d'induction des chaleurs (comportement d'acceptation de la monte du mâle) et des ovulations sont la pratique la plus efficace pour désaisonner la reproduction. Or, le contexte réglementaire et sociétal oriente vers une moindre utilisation des hormones en élevage, dans l'objectif de réduire leurs résidus dans les produits animaux et le risque de contamination de l'environnement via les effluents.

Des méthodes alternatives aux hormones existent, notamment la pratique de « l'effet mâle ». L'effet mâle consiste à stimuler l'activité ovulatoire de chèvres au repos sexuel par leur exposition à des mâles sexuellement actifs (l'activité sexuelle de ces mâles pouvant être stimulée par des traitements lumineux). Toutefois, le développement de cette pratique en élevage est freiné par la forte variabilité des résultats obtenus, notamment dans le cadre de l'insémination artificielle, qui implique la détection des chaleurs des chèvres afin de les inséminer au bon moment et d'obtenir une fertilité satisfaisante. Or la détection des chaleurs des chèvres est chronophage pour les éleveurs.

L'objectif du projet est d'évaluer l'efficacité de la détection automatisée des chaleurs, à l'aide de colliers portés par les chèvres et mesurant en continu leur niveau d'activité, après une induction des chaleurs et des ovulations par effet mâle. Les chaleurs sont associées à une suractivité des chèvres, qui est détectée par les colliers.

Un total de 150 animaux (en 2019 50 chèvres adultes en lactation et 30 boucs pubères en 2020 40 chèvres adultes en lactation et 30 boucs pubères), de race alpine, seront utilisés, dans leurs conditions d'élevage habituelles.

Ce projet comprend 1 procédure concernant les prélèvements sanguins dans la veine jugulaire (au niveau du cou).

La règle des 3R sera respectée comme suit

Remplacement : L'activité sexuelle du bouc et de la chèvre, l'ovulation et l'expression des chaleurs sont des phénomènes complexes qui ne peuvent pas être étudiés *in vitro*.

Réduction : Le nombre d'animaux a été défini de façon à pouvoir évaluer l'efficacité d'un système automatisé de détection des chaleurs et la fertilité des chèvres en fonction du moment de détection des chaleurs. En outre, il s'agit de 2 groupes de chèvres élevées et mises à la reproduction à la même période dans la conduite habituelle de l'élevage.

Raffinement : Les animaux seront hébergés en groupe, sur une litière paillée, le milieu sera enrichi (pneus suspendus régulièrement remplis de foin, plateformes, brosses). Les animaux feront l'objet d'une surveillance journalière pendant toute la durée du protocole, en particulier au moment de la traite deux fois par jour pour les chèvres. En cas de symptôme inquiétant, une intervention vétérinaire aura lieu et l'animal sera sorti du protocole si nécessaire. Les prélèvements sanguins seront réalisés par des opérateurs expérimentés (animaliers). Des précautions seront prises afin d'éviter tout risque de phlébite (tonte au niveau du cou pour mieux visualiser les veines, et si nécessaire application d'un baume antiseptique et cicatrisant).

15748 L'insuffisance cardiaque est une maladie fréquente, touchant un million de personnes en France et dont la fréquence d'apparition a doublé en 10 ans. Elle correspond à l'incapacité du cœur à pomper suffisamment de sang pour répondre aux besoins de l'organisme et est associée à des problèmes de production, de transport et d'utilisation de l'énergie. L'objectif général du projet est de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la survenue des troubles du métabolisme énergétique associés à l'insuffisance cardiaque. Le NAD est un coenzyme essentiel du métabolisme énergétique et un substrat pour des enzymes impliquées dans la signalisation du stress énergétique et du stress oxydant et notamment la résistance à un stress cellulaire spécifique appelé stress du réticulum endoplasmique impliqué dans le développement de l'insuffisance cardiaque. Les précédents résultats du laboratoire ont montré des effets bénéfiques de la

supplémentation en nicotinamide riboside (NR), une vitamine B3 précurseur du NAD, sur la fonction cardiaque dans un contexte de cardiomyopathie dilatée. Cette amélioration fonctionnelle est corrélée à une protection du métabolisme du NAD et associée à l'induction de sa biosynthèse par l'enzyme kinase NMRK2. Ce projet vise à caractériser l'effet potentiellement protecteur de la surexpression dans le cœur de l'enzyme NMRK2 pour le métabolisme énergétique cardiaque dans un contexte de stress du réticulum endoplasmique ainsi que dans un stress du cœur de type infarctus du myocarde. Pour limiter l'utilisation des animaux, nous réalisons certaines expériences sur des cultures de cellules cardiaques. Cependant ces modèles de culture *in vitro* ne peuvent pas reproduire toute la complexité des régulations physiologiques de la fonction cardiaque qui est en lien avec le système nerveux et les organes périphériques. L'expérimentation animale reste donc nécessaire pour s'approcher le plus possible de la pathologie humaine. Toutes les procédures de ce projet sont conçues pour respecter le principe des 3R (Réduction, Raffinement, Remplacement). Une planification minutieuse a permis de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en préservant la validité statistique de l'étude. Les fonctions cardiovasculaires sont étudiées par des méthodes non invasives permettant de limiter le nombre d'animaux. Dès que cela est nécessaire des anesthésiques et des analgésiques sont utilisés. Les animaux sont euthanasiés en fin d'expérimentation et les tissus prélevés sont partagés entre les domaines explorés afin de minimiser encore le nombre d'animaux utilisés. Les animaux seront surveillés quotidiennement et leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour minimiser au maximum le stress et la douleur. Afin d'améliorer leurs conditions d'hébergement, un environnement enrichi est procuré dans leurs cages. Un total de 400 souris est nécessaire pour le projet.

15749 Ce projet est la continuité du projet déposé dans un autre Etablissement. L'analyse de la masse grasse non invasive se faisant dans notre EU.

La stéatohépatie non-alcoolique (Non-alcoholic Fatty Liver Disease ou NAFLD) est la manifestation hépatique du syndrome métabolique et l'une des maladies du foie les plus courantes dans les pays développés. Cette pathologie se réfère à un large éventail de dommages au foie, allant de la stéatose pure à une pathologie plus grave, à savoir la stéatohépatite (NASH) caractérisée, en plus de la stéatose, par une inflammation et une fibrose. La NAFLD, qui affecte jusqu'à 30% de la population générale, est souvent associée avec l'obésité, et la prévalence augmente avec l'obésité morbide et le diabète de type 2. La progression vers la NASH est influencée par la persistance et la gravité de la cause initiale de la stéatose hépatique. L'importance clinique de la NASH est liée à son risque de progresser vers la cirrhose et même le carcinome hépatocellulaire. Etant donnée l'augmentation drastique de l'incidence de l'obésité au cours des dernières décennies, le traitement de la NAFLD devient un défi majeur pour la santé publique.

Les données récentes de la littérature suggèrent que le sulfure d'hydrogène joue un rôle important dans la physiologie et la pathologie du foie. Le sulfure d'hydrogène est une molécule de signalisation endogène chez les mammifères, biosynthétisé lors du métabolisme des acides aminés dans les tissus de l'organisme et par le microbiote intestinal. Les données de la littérature indiquent que l'altération du métabolisme endogène du sulfure d'hydrogène est corrélée chez l'Homme avec les symptômes du diabète et la cirrhose du foie. De plus, il a été rapporté une diminution de la biosynthèse hépatique du sulfure d'hydrogène dans les modèles animaux de NAFLD. L'administration de molécules donneuses de sulfure d'hydrogène peut prévenir le développement de la NASH dans ces modèles animaux mais les mécanismes responsables des effets bénéfiques du sulfure d'hydrogène ne sont pas élucidés.

L'objectif du projet est d'étudier 1/ l'importance physiopathologique du métabolisme du sulfure d'hydrogène, tout particulièrement dans le foie, dans différentes situations (état nourri, jeûne, réalimentation après un jeûne, obésité) et 2/ les mécanismes mis en jeu lors d'une modification du métabolisme du sulfure d'hydrogène. Le projet implique un nombre total de 832 souris et implique plusieurs modèles animaux de NAFLD des souris sauvages ayant une NAFLD induite par des régimes nutritionnelles (régime gras, régime déficient en méthionine et choline) et des souris génétiquement obèses. Ces souris seront utilisées pour des analyses non invasives incluant un traitement avec des molécules de sulfure d'hydrogène et certaines recevront des isotopes stables.

Ce projet, d'une durée de 5 ans, permettra de mieux comprendre les inter-relations entre métabolisme hépatique du sulfure d'hydrogène et NAFLD dans des modèles animaux de cette pathologie.

Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum mais suffisant pour permettre des analyses statistiques valables entre les différentes conditions. L'étude du rôle du sulfure d'hydrogène dans le développement de la NAFLD nécessite le recours à des modèles *in vivo* mimant le plus fidèlement la pathologie humaine puisque la NAFLD est un phénomène qui prend place au sein d'un organe entier, à savoir le foie, très souvent dans un contexte *in vivo* d'obésité. La réalisation d'explorations fonctionnelles sur animal vigile ne peut donc pas être substituée par des approches *in vitro*, qui par ailleurs ne peuvent pas reproduire les différents stades de développement de la NAFLD (foie stéatosé, NASH). De plus, afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligée aux animaux, les animaux seront observés quotidiennement et évalués à l'aide de points limites bien définis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

Ce projet apportera des données importantes sur le rôle du métabolisme du sulfure d'hydrogène dans le développement de la NAFLD, et d'identifier de nouvelles pistes thérapeutiques pour le traitement de cette pathologie.

15750 Le SARS-CoV-2, virus responsable de la COVID-2019 pour Coronavirus disease 2019 est un nouveau coronavirus découvert dans la ville de Wuhan dans la province de Hubei en Chine en décembre 2019. Il est responsable d'une épidémie dont l'épicentre se trouve en Chine. L'épidémie s'étend à de nombreux pays, dont la France et est actuellement qualifiée de pandémie. Les coronavirus sont des virus à ARN enveloppés appartenant à la famille des Coronaviridae, genre betacoronavirus. Chez l'homme, six espèces de coronavirus étaient jusqu'alors connues les HCoV saisonniers, le SRAS –CoV, le MERS-CoV et maintenant le SARS-CoV-2 identifié comme le septième coronavirus pathogène pour l'homme. Ce coronavirus est constitué d'un ARN génomique, d'une nucléocapside protéique (N), d'une enveloppe constituée d'une bicouche lipidique, d'une enveloppe protéique (E), de protéine membranaire (M) et de protéine spike (S).

Des études sont en cours pour tester des thérapies possibles pour la COVID-19 afin de répondre au plus vite à cette pandémie. En effet, 115 vaccins candidats sont signalés, dont 78 en développement actif confirmé. À la même date, 8 essais cliniques vaccinaux sont listés parmi les 410 essais relatifs à la COVID-19.

Cinq vaccins en cours d'étude clinique sont centrés sur la protéine S, parfois dans son intégralité, sous la forme d'ADN ou d'ARNm codant pour cette protéine.

Certaines molécules vont traiter les symptômes, telles que le Remdesivir qui est un antiviral. D'autres groupes testent l'utilisation de la transfusion de plasma de patients guéris de la COVID-19, contenant des anticorps dirigés contre le virus, et qui pourrait transférer cette immunité à un patient souffrant de la COVID-19. Des antiparasitaires sont également testés tel que l'Ivermectine, permettant de réduire la charge virale du coronavirus en 48h mais le stade de développement est précoce car limité à l'étude en laboratoire sur des cellules.

Actuellement, en l'absence de médicament, un traitement symptomatique est appliqué aux cas bénins. Il s'agit de limiter les effets importuns maux de tête, maux de gorge, courbatures. Pour cela, les patients peuvent prendre du paracétamol (Doliprane, Dafalgan, Efferalgan).

Les cas les plus graves sont admis dans des unités dédiées en service de réanimation. Les patients sont plongés dans un coma artificiel, ils sont sous assistance respiratoire et suivent souvent des traitements antibiotiques.

Certaines de ces stratégies ne sont pas spécifiques au pathogène et elles sont associées à de nombreux effets secondaires. Les nouvelles stratégies cherchent à induire une réponse immune cellulaire et/ou humorale mémoire en limitant les effets secondaires et pour cela les approches ciblent plus spécifiquement les protéines constituant le SARS-CoV-2.

Nous aimerions donc tester différents peptides spécifiques du SARS-Cov-2 capables d'activer une réponse humorale et analyser les effets engendrés par cette activation, c'est à dire si l'immunisation induit des anticorps neutralisants ou facilitants dans un modèle d'immunisation chez la souris.

Ce type d'étude nécessite une preuve d'efficacité *in vivo* dans des modèles précliniques, c'est pourquoi nous voulons tester ces thérapies chez deux souches de souris la Balb/c et la souris Swiss (SW), ainsi que deux types d'injections en sous cutanée ou dans le coussinet plantaire et aussi tester 3 doses de chaque peptide afin de déterminer celle qui induit statistiquement une différence.

Le nombre d'animaux utilisés sera de 1340 souris pour combiner un nombre réduit d'animaux avec une pertinence statistique. Le suivi des animaux sera quotidien et la gestion de la douleur maîtrisée le plus adéquatement possible afin d'apporter les soins nécessaires le plus rapidement aux animaux. Pour limiter le stress et l'inconfort, les animaux sont maintenus dans des cages ventilées dans un cycle jour/nuit de 12h/12h avec un accès à l'eau et à la nourriture à volonté ainsi qu'un nombre maximum de 5 animaux/cage et des brindilles de papier pour s'enfouir et se cacher. De plus, chaque injection en intrapéritonéale, en sous cutanée ou dans le coussinet plantaire sera réalisée avec un agent anesthésique volatil via une inhalation d'un mélange air-isoflurane v/v dans une cage à induction (à 4% sous un débit d'air de 1 L/min) puis à 2% avec le masque. L'analgésique permettant de réduire la douleur s'appliquera sous forme de goutte contenant de la lidocaïne lors des prélèvements rétro-orbitaux, ou sous forme de crème au niveau du coussinet plantaire. Ces gestes seront réitérés à chaque fois qu'un signe clinique sera visible pour atténuer au maximum la douleur de l'animal.

15751 Les maladies des plantes sont causées par des virus, bactéries ou champignons entraînant des pertes économiques considérables pour l'agriculture.

Un dépistage de ces maladies est nécessaire voir obligatoire pour certaines cultures, afin de limiter rapidement leur propagation. La méthode d'analyse immuno-chimique (ELISA) à base d'anticorps est la méthode officielle pour le diagnostic des pathogènes des plantes (phytodiagnostic)

L'emploi des anticorps monoclonaux dans le domaine du phytodiagnostic présente des avantages importants pour les analyses ELISA réglementaire dans le cadre de la protection des plantes.

La production des hybridomes immortels à partir des souris constitue une source inépuisable d'anticorps monoclonaux et limite la mise à mort des animaux pour faire face aux volumes d'analyses des pathogènes responsables des maladies des plantes.

Cette facilité de production d'anticorps monoclonaux *in vitro* combinée aux caractéristiques d'immortalité des hybridomes constitue un avantage indéniable pour le dépistage des maladies des plantes et limite l'utilisation des animaux à des fins de diagnostic immuno-chimiques.

Le projet sera mené dans le respect des règles de l'expérimentation animale, en particulier de la règle des 3R

- Remplacement Nous avons besoin de recourir à l'animal pour développer de nouveaux anticorps monoclonaux, actuellement aucune méthode ou technique ne permet de développer des anticorps *in vitro*.

- Réduction Le nombre d'animaux nécessaire à ce projet est réduit au minimum afin d'obtenir une quantité suffisante d'anticorps monoclonaux dès la 1ère production. Notre besoin de production d'anticorps est estimé à 40 souris /an sur une durée de 5 ans soit 200 souris.

- Raffinement Pour réduire au maximum les sources de souffrance, les animaux seront anesthésiés avant les prélèvements. Les souris seront élevées en communauté dans des cages comprenant des éléments d'enrichissement et dans des conditions appropriées pour préserver leur bonne santé et leur bien-être.

15752 Au jour d'aujourd'hui, l'hépatocarcinome cellulaire reste une pathologie incurable, ne disposant d'aucun traitement efficace. En effet, la plupart des essais cliniques réalisés contre ce cancer cherchent à valider des molécules développées dans d'autres pathologies, et pas spécifiquement dans le contexte du HCC. Dans ce projet, nous avons recours à une méthode protéomique

précédemment validée afin d'analyser dans un premier temps le protéome accessible spécifique des lésions HCC. Cette analyse globale nous a permis d'identifier un set de nouveaux candidats biomarqueurs, qui serviront de base à l'établissement de nouvelles thérapies ciblées utilisant des anticorps couplés à des molécules cytotoxiques. Nous sommes actuellement en train d'étudier la fonction de plusieurs de ces cibles, de façon à comprendre, d'une part, leur rôle dans la progression du HCC et, d'autre part, de pouvoir développer nos propres anticorps contre les candidats jugés les plus prometteurs.

Pour l'expérience envisagée, il n'existe pas une méthode alternative n'utilisant pas d'animaux. La présente étude prévoit d'implanter directement dans le foie des souris immunodéficientes (athymic nude) des fibroblastes surexprimant ou sous-exprimant nos protéines d'intérêt avec des cellules cancéreuses hépatiques Luc+ comme modèle pour étudier le cancer hépatique.

Ces souris serviront à évaluer l'importance de nos protéines stromal dans la croissance tumorale.

Les 3 R sont pris en considération de la façon suivante :

Remplacer : Des modèles *in vitro* ont été mis en oeuvre en amont du projet afin de ne poursuivre des expérimentations *in vivo* uniquement sur des cibles thérapeutiques ayant déjà démontré un intérêt *in vitro*.

Réduire : Une étude statistique à été mené en amont du projet afin d'évaluer le nombre d'animaux nécessaire pour avoir des résultats scientifiques statistiquement pertinent. Nous réalisons également un suivi longitudinal des animaux en utilisant des techniques d'imagerie qui nous permettent de réduire le nombre d'animaux utilisé.

Raffiner : Les techniques d'imagerie *in vivo* qui vont être utilisées nous permettent de détecter les signes de développement de la maladie avant l'apparition de signes cliniques plus sévères.

Au total nous avons prévus d'inclure 192 souris dans ce projet scientifique.

Les animaux seront hébergés dans des cages à couvercle filtrant et numérotées (5 souris par cage). Ils disposeront à volonté de nourriture et d'eau stérile. Un monitoring quotidien sera effectué pour s'assurer de la bonne santé et du confort des animaux.

15753 La mémoire de reconnaissance sociale consiste à différencier un congénère inconnu d'un congénère familier, et elle est altérée dans la plupart des maladies psychiatriques. Chez l'Homme, comme chez les rongeurs, un fonctionnement normal de l'hippocampe est requis pour ce type de mémoire et l'incapacité de se rappeler ses interactions sociales est une caractéristique majeure des patients avec des lésions hippocampiques. L'implication d'une petite sous-région de l'hippocampe (région CA2) dans la formation de cette mémoire a récemment été démontrée, ainsi que sa vulnérabilité dans plusieurs pathologies psychiatriques, dont la schizophrénie. Cependant l'étude des mécanismes cellulaires a aussi montré que d'autres structures cérébrales pourraient influencer l'activité du CA2 selon le type (olfactif, social ou contextuel) d'information à mémoriser.

Ce projet a pour but de caractériser les régions cérébrales respectivement activées par une information sociale ou contextuelle chez la souris. Pour cela nous utiliserons des approches d'infections virales sur des souris transgéniques permettant d'inactiver ou d'activer spécifiquement les structures cérébrales-cibles afin

- d'étudier les circuits cérébraux activés par la composante olfactive de stimuli sociaux et de définir leurs liens anatomiques et fonctionnels avec la région CA2 de l'hippocampe.

- d'étudier les réponses comportementales de ces animaux en réalisant des tests olfactifs, sociaux et cognitifs

- d'étudier l'activité cérébrale par imagerie *in vivo* pendant des stimulations olfactives ou sociales ou au cours de la mémoire sociale. Nous utiliserons une technique d'imagerie ultrasonore fonctionnelle (fUS) en temps réel, sorte d'échographie qui permet d'étudier l'activité et la connectivité cérébrale chez l'animal vigile.

Ces études seront aussi réalisées dans un modèle murin de schizophrénie dans lequel le fonctionnement de la région CA2 de l'hippocampe et la mémoire de reconnaissance sociale sont

altérés (lignée LgDel, qui présente une délétion homologue à celle correspondant au plus fort facteur de risque de développer la pathologie chez l'Homme).

Enfin, l'effet bénéfique potentiel d'un enrichissement contrôlé de l'environnement pendant trois semaines sera étudié sur les différents paramètres anatomiques, comportementaux et fonctionnels chez les souris contrôles et transgéniques. Dans le modèle LgDel, nous évaluerons son impact sur la mémoire sociale et l'activité cérébrale des souris déficientes, dans le but de proposer une piste thérapeutique.

Pour ce projet nous utiliserons 1224 souris pour une durée de cinq ans. L'utilisation de modèles animaux est indispensable pour étudier la transmission de l'information entre différentes régions cérébrales et l'impact de modifications d'activité neuronale sur le comportement animal envisagés dans ce projet. Aucun modèle *in vitro* ne permet de remplacer les expériences envisagées. L'utilisation du modèle souris nous permet de mimer la physiologie et la pathologie humaine et de corrélérer les modifications anatomiques et physiologiques observées *in vivo* à des déficits comportementaux (sociaux, cognitifs ou sensoriels). Ces approches expérimentales ne peuvent pas être remplacées par des méthodes substitutives (Remplacement). Pour réduire le nombre d'animaux, nous avons estimé la taille des échantillons permettant une analyse statistique efficace des résultats grâce aux données collectées au cours d'expériences précédentes (Réduction). Pour éviter toute souffrance les procédures de chirurgie se feront sous anesthésie générale. Les animaux seront observés et manipulés quotidiennement afin de minimiser le stress et la douleur qui seront évalués à l'aide de points limites adaptés à chaque procédure (Raffinement). La réalisation de ce projet apportera des données nouvelles sur les réseaux neuronaux impliquant le CA2 dans la mémoire sociale, sur leurs modifications fonctionnelles dans un modèle de schizophrénie et sur l'effet bénéfique potentiel d'un enrichissement de l'environnement sur les réponses sociales qui sont perturbées dans les pathologies psychiatriques.

15754 L'hémophilie B est une maladie hémorragique rare affectant principalement les hommes (1 naissance de garçons sur 25-30 000). Il s'agit d'une maladie génétique et le gène affecté est celui du facteur IX, une protéine jouant un rôle crucial dans la cascade de la coagulation. Il existe plusieurs types d'hémophilie B (mineure, modérée et sévère) en fonction du taux résiduel du facteur IX. L'hémophilie B sévère est due à une absence totale de facteur IX et si la maladie n'est pas traitée, l'espérance de vie est en moyenne de 15 ans. Actuellement le traitement standard de l'hémophilie B repose sur l'injection intra-veineuse régulière (2 fois/semaine) de facteur IX soit recombinant, soit purifié à partir de plasma. Ce traitement est coûteux et 70% des patients hémophiles dans le monde n'y ont pas accès. Actuellement des approches de thérapie génique sont testées dans des essais cliniques. Dans cette approche, un vecteur viral portant une copie normale du gène du facteur IX est injecté aux patients et ce vecteur qui cible les cellules du foie (l'organe physiologique de fabrication du facteur IX) va permettre à l'organisme du patient de produire du facteur IX actif afin de restorer une coagulation normale. Dans la pratique, l'obstacle principal au succès de cette approche est le taux d'expression de la protéine qui n'est pas toujours produite en quantité suffisante pour assurer une hémostasie normale. Afin de contourner cet obstacle, des variants de facteur IX avec une activité augmentée sont à l'essai. Le but de ce projet est donc de tester un de ces variants, le facteur IX-CB2679d, dans une approche de thérapie génique afin de mesurer son efficacité à restorer la coagulation par rapport à un autre variant de facteur IX, le facteur Padua actuellement utilisé dans les essais de thérapie génique.

Le système de la coagulation est complexe, faisant intervenir de nombreux acteurs, autant des molécules procoagulantes que leurs inhibiteurs mais aussi des phospholipides membranaires. Actuellement les tests disponibles *in vitro*, même s'ils se sont beaucoup améliorés depuis quelques années, ne permettent pas de reproduire l'intégralité de ce processus. Par conséquent, afin de tester l'efficacité anti-hémorragique du facteur IX modifié, il est crucial de pouvoir tester son effet dans un modèle animal d'hémophilie B.

Nous prévoyons d'utiliser 318 souris pour ce projet. Ce nombre nous permettra d'une part de réaliser une première expérience de validation du modèle et des molécules à tester et d'autre part de tester cinq doses de vecteur pour les différents variants de facteur IX. Des groupes de 10 souris sont

prévus afin d'assurer une réponse statistiquement analysable. Les souris seront randomisées pour les attribuer aux différents groupes.

Afin de répondre à la règle des 3Rs, les procédures utilisées se feront dans le cadre adapté d'un hébergement agréé, respectant au maximum le bien-être des animaux avec un enrichissement du milieu (morceaux de bois à ronger, filaments de papier kraft pour faire un nid), en limitant la souffrance par le respect des méthodes anesthésiques et analgésiques. L'ensemble des expériences sera effectué par une personne habilitée à expérimenter sur animaux.

15755 L'épilepsie correspond à un ensemble de pathologies qui se caractérisent par une hyperactivité synchronisée de réseaux de neurones du cerveau et qui touche 500000 personnes en France. Il n'existe pas de médicaments permettant de soigner les causes de l'épilepsie mais seulement des anti-épileptiques qui régulent l'activité des réseaux neuronaux excitateurs ou inhibiteurs. Il est donc urgent d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour soulager les patients pharmaco-résistants (aux anti-épileptiques) et/ou véritablement soigner l'épilepsie.

L'épilepsie du lobe temporal (TLE) qui est la forme la plus fréquente d'épilepsie et touche environ 60% des patients. Au cours des dix dernières années, il a été montré que la TLE s'accompagne d'une réaction inflammatoire au niveau des régions les plus touchées, principalement de l'hippocampe, du cortex et du thalamus. Cette réaction repose sur des interactions complexes entre les neurones hyper-excités, les cellules gliales qui les entourent, les constituants de la barrière hématoencéphalique et sans doute aussi le système immunitaire.

Identifier des cibles impliquées uniquement dans l'inflammation, et non dans le fonctionnement normal du système comme le font les anti-épileptiques actuels, serait donc un avantage thérapeutique.

Le but de notre projet est de mieux comprendre comment le dysfonctionnement des cellules gliales affecte la progression de la maladie. Nous disposons pour cela d'un modèle murin de TLE et de lignées d'animaux transgéniques nous permettant de suivre ou de manipuler spécifiquement les cellules gliales. Seul le modèle souris donne accès à ces outils transgéniques nécessaires à l'étude des mécanismes moléculaires mis en jeu *in vivo*. Par ailleurs, comme mentionné ci-dessous, notre projet vise à étudier les relations entre différents types cellulaires du parenchyme cérébral ainsi qu'entre les systèmes nerveux et immunitaires. Il nécessite donc l'utilisation d'approche *in vivo* et *ex vivo* et ne peut être réalisé par la mise en oeuvre d'approches uniquement *in vitro*. Il faut noter de plus que de nombreuses études ont montré que le phénotype des cellules gliales est modifié dans les systèmes en culture. L'approche *in vivo* est donc indispensable à notre projet.

Nous appliquerons la règle des 3R de la façon suivante

Remplacer Seul le modèle souris donne accès à ces outils transgéniques nécessaires à l'étude des mécanismes moléculaires mis en jeu *in vivo*. Par ailleurs, comme mentionné ci-dessous, notre projet vise à étudier les relations entre différents types cellulaires du parenchyme cérébral ainsi qu'entre les systèmes nerveux et immunitaires. Il nécessite donc l'utilisation d'approches *in vivo* et *ex vivo* et ne peut être réalisé par la mise en oeuvre d'approches uniquement *in vitro*. Il faut noter de plus que de nombreuses études ont montré que le phénotype des cellules gliales est modifié dans les systèmes en culture. L'approche *in vivo* est donc indispensable à notre projet.

Réduire Nous avons limité le nombre d'animaux au strict minimum permis par les tests statistiques. Le suivi longitudinal non invasif réalisé en imagerie et en électro encéphalographie permet de réduire le nombre de groupes d'animaux utilisés, sans compromettre les objectifs du projet.

Raffiner le projet s'appuie sur des méthodologies respectueuses du bien-être des animaux mises en oeuvre uniquement par du personnel technique et de recherche formé et qualifié. Des points limites en adéquation avec les besoins expérimentaux ont été déterminés afin d'éviter toute souffrance ou détresse des animaux. Nous y veillerons par observation quotidienne. Tous les protocoles modérés à sévères s'effectueront sur l'animal anesthésié. Les chirurgies seront effectuées en conditions d'asepsie, avec maintien de la température corporelle, une analgésie post-opératoire sera délivrée. En préventif, une prophylaxie par antibiotiques sera mise en place.

Afin d'étudier l'impact de ces manipulations sur l'épilepsie, nous mettrons en oeuvre une combinaison d'approches électrophysiologiques, d'imagerie, de manipulations génétiques, d'immunohistochimie, et des techniques de biologie cellulaire et moléculaire. Ces approches permettront de mieux comprendre les voies de signalisation impliquées dans les interactions neurone-glie du cerveau épileptique. Les souris épileptiques seront surveillées quotidiennement et seront analysées pendant la phase de latence (3 jours post-injection), pendant la phase d'épilepsie récurrente (3 semaines post injections) et jusqu'à 2 mois post injections.

Cette étude nécessitera 1176 animaux sur cinq ans.

15756 Notre établissement est un laboratoire agréé par le Ministère de l'Agriculture pour réaliser les analyses des contrôles officiels de coquillages issus des zones de production et mis sur le marché. Il est ainsi amené à mettre en oeuvre plusieurs méthodes d'analyse pour évaluer la salubrité des coquillages dont le dosage des toxines paralysantes dans les coquillages selon la méthode officielle par bioessai sur souris. Ce projet concerne la réalisation des analyses du contrôle officiel des toxines paralysantes dans les coquillages.

Notre établissement applique la méthode officielle publiée par le laboratoire national de référence ou LNR sous l'intitulé "Analyses de toxines paralysantes (ou PSP) par bioessais sur souris présentes dans la chair de coquillages". Cette méthode est adaptée des méthodes diffusées par le Laboratoire Communautaire de Référence « Biotoxines Marines » basées sur la méthode AOAC n° 959.08 1990 pour les toxines paralysantes (PSP).

Le protocole expérimental consiste en l'injection de 1 ml d'extrait de coquillages ou d'une solution étalon de saxitoxine par voie intrapéritonéale dans l'abdomen d'un lot de souris mâles âgées de 3 à 4 semaines et de poids compris entre 18 et 20 g (3 à 8 animaux maximum par échantillon selon la concentration). Les symptômes des souris, spécifiques aux toxines en présence, sont observés pendant 1 heure. Le délai de mort des souris (test de toxicité aigüe) permet de quantifier les toxines. Passé le délai d'une heure, la durée d'observation imposée dans les méthodes officielles n'est jamais prolongée, les souris survivantes sont systématiquement euthanasiées par dislocation cervicale afin de limiter la douleur/souffrance animale.

Dans le but de réduire au maximum les contraintes imposées aux souris et de manière à recevoir des animaux répondant parfaitement aux pré-requis du bioessai (poids compris entre 18 et 20 g), les animaux sont commandés chez nos fournisseurs pour un poids bien spécifique. La garantie de ce poids nécessite alors de réaliser les analyses 24 h après la réception des animaux dans notre établissement. Passé ce délai, la variabilité du poids des animaux est telle qu'on ne dispose plus de lots homogènes, ce qui rend alors impossible la réalisation des analyses. Afin de réduire leur stress, les animaux sont répartis par groupe dans des cages conformes à la réglementation équipées d'enrichissement (igloo) et ce, dès leur réception dans notre établissement. Après distribution des soins appropriés (nourriture, biberons d'eau), les souris sont laissées au repos. Une visite en fin de journée puis le lendemain matin, au moment de l'enlèvement de la nourriture, permet de s'assurer de leur bon état général.

Le nombre de souris utilisées par an fluctue en fonction du nombre d'échantillons reçus. Jusqu'en 2015, 100 à 150 souris étaient utilisées en moyenne par an. Ce nombre a diminué fortement en 2016 suite à la décision de la Direction Générale de l'Alimentation de ne pas faire de prélèvement en 2016. A partir de 2017, le plan de surveillance a été réactivé. On estime entre 750 et 1750 le nombre d'animaux utilisés pour ce projet (750 correspondant au nombre de souris pour 5 années sans crises sanitaire, 1750 correspondant au nombre de souris pour 5 années avec 1 crises sanitaire annuelle). Pour réduire au maximum le nombre d'animaux, les séries d'échantillons sont dimensionnées de façon optimale en fonction des délais de rendu des résultats. De plus, le personnel en charge des bioessais a été formé par le LNR. Il maintient ses compétences annuellement en participant à un essai interlaboratoire organisé par le LNR. Sa formation et son expérience lui permet notamment d'évaluer au plus juste le nombre d'animaux à commander pour chaque série de tests en fonction du type d'échantillons reçus (PSPC, alerte). Enfin, en cas

d'échantillons contaminés, l'expérience du laboratoire permet de limiter au maximum le nombre d'animaux nécessaires à la recherche de la dilution adéquate de l'échantillon (3 souris maximum). Notre établissement est un laboratoire agréé par le Ministère de l'Agriculture pour réaliser les analyses de surveillance et de contrôle pour le compte de différentes DD(CS)PP. Dans le règlement (CE) N°2074/2005 le bioessai sur souris est la méthode de routine et de référence en cas de litige jusqu'au 31/12/2018. A partir du 01/01/2019, la méthode officielle pour les analyses de routine réalisées par les laboratoires agréés reste le bioessai mais en cas de contestation d'un résultat par bioessai, le LNR mettra en œuvre une méthode chromatographique AOAC OMA 2005.06 dite de Lawrence. Cette méthode étant très complexe à mettre en œuvre en routine, le LNR travaille sur une autre méthode chimique dite PCOX qui devra être validée d'ici fin 2019 pour une mise application par le réseau de laboratoires agréés dont notre établissement au 01/01/2020. Ce transfert de méthode mettra ainsi fin à l'expérimentation animale au sein de notre établissement.

15757 Selon l'OMS, l'édentation partielle ou totale touche environ 7 millions de personnes en France. L'implantologie dentaire est une solution efficace pour pallier aux problèmes d'édentation, avec des taux de réussite clinique supérieurs à 90 %.

La photothérapie (ou Low-Level Laser Therapy – LLLT) est une modalité non invasive proposée en dentisterie clinique pour optimiser la production osseuse et la cicatrisation tissulaire. Elle permettrait également de diminuer les douleurs et les inflammations péri-opératoires.

L'ATP38® est un dispositif médical fonctionnant sur ce principe des LLLT des longueurs d'ondes pures sont transmises localement pour être captées par les cellules affaiblies. Le processus de régénération cellulaire est ainsi accéléré. Contrairement à d'autres dispositifs de photothérapie, l'ATP38® permet de traiter de plus grandes surfaces, en garantissant la dose d'énergie sur la surface traitée.

Le but de ce travail est d'étudier les effets de ce traitement par photothérapie par l'ATP38® sur l'ostéointégration d'implants dentaires et la cicatrisation tissulaire gingivale péri-implantaire.

La règle des 3 R est largement prise en compte puisque

- Le modèle animal a été réservé à la validation définitive du dispositif, par des mesures *in vivo*, notamment métaboliques (le matériel utilisé ayant déjà été mis sur le marché).
- Le modèle animal de grande taille (modèle porcin) permet, dans des conditions proches de la pratique humaine, de valider ces essais avant l'utilisation chez l'homme (exigence ANSM).
- Il s'agit de procédures chirurgicales standard pour lesquelles une anesthésie et une analgésie (per et postopératoire) adaptées sont utilisées. La souffrance animale est donc réduite au maximum. Les animaux sont stabulés au maximum 5 jours en amont de ces procédures, dans un milieu enrichi comme exigé par la réglementation animale (balle, cordes, jouets non dangereux notamment du risque d'inhalation et/ou d'ingestion).
- Le nombre d'animaux par groupe sera de 4, nombre minimum pour atteindre une significativité des variations attendues des mesures physiques et biologiques
- Le nombre total d'animaux sera de 8 (2 groupes de 4)

15758 La dépression, qui est aujourd'hui la maladie psychiatrique la plus répandue avec une prévalence de 6 à 10% en Europe, représente un problème majeur de santé publique. En dépit de cette fréquence élevée et du coût économique de sa prise en charge, la compréhension des mécanismes impliqués dans la physiopathologie de la dépression reste encore limitée à ce jour. En effet, il n'a toujours pas été expliqué l'ensemble des facteurs de risque, la résilience et les mécanismes de résistance aux traitements classiques qui permettraient le développement de traitements alternatifs. De nombreuses données montrent que la composante inflammatoire et immunitaire (notamment via l'augmentation de la synthèse de molécules pro-inflammatoires) est impliquée dans le développement des symptômes dépressifs ainsi que dans la résistance aux traitements antidépresseurs. L'étude de la voie neuro-immunitaire (interaction entre systèmes immunitaire et nerveux) semble donc un candidat de choix pour le développement de nouveaux traitements.

L'objectif spécifique de cette étude est d'évaluer, à l'aide d'un modèle animal adapté, le rôle de l'inflammation dans la réponse aux traitements antidépresseurs ainsi que les mécanismes impliqués. Plus précisément, nous évaluerons le rôle spécifique de l'enzyme indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO) au niveau cérébral et périphérique. Pour cela, nous utiliserons un modèle d'inflammation chez la souris grâce à l'administration d'une substance, le dextran sulfate sodium (DSS), induisant une colite suivie de symptômes de dépression pendant la phase de récupération. Ce modèle constitue donc un modèle de "dépression inflammatoire".

Dans un premier temps, nous évaluerons le rôle d'IDO au niveau cérébral dans la vulnérabilité à la dépression inflammatoire (65 animaux). Sur ces animaux, nous ferons une caractérisation comportementale (évaluation de l'état dépressif), biochimique (évaluation de l'inflammation cérébrale et périphérique) et neuro-immunologique (rôle d'IDO au niveau cérébral et ses effets sur les populations neuronales et gliales). La majorité de l'IDO activée lors d'un événement inflammatoire se trouve en périphérie, et notamment au niveau intestinal. Nous souhaitons donc évaluer également le rôle d'IDO au niveau de l'intestin, ainsi que ses interactions possibles avec le microbiote intestinal. Nous reproduirons donc la même expérience avec pour objectif l'étude d'IDO au niveau de l'intestin (65 animaux). Les méthodes de prélèvement du cerveau et de l'intestin étant incompatibles, nous ne pouvons pas grouper les 2 procédures. Le nombre total des souris pour ce cette première partie de l'étude est donc $65+65=130$ souris.

Si notre hypothèse est correcte et le modèle montre une activation d'IDO, nous souhaitons ensuite mettre en place un traitement antidépresseur et/ou anti-inflammatoire pour tenter d'abolir l'état dépressif de nos animaux enflammés vulnérables en reproduisant les procédures précédentes. 390 souris seront utilisées pour évaluer l'IDO au niveau cérébral et 390 souris pour évaluer l'IDO au niveau intestinal. Le nombre total des souris pour ce cette deuxième partie de l'étude est donc $390+390=780$ souris.

Le total nombre des animaux utilisés dans ce projet sera donc 130 (première partie) + 780 (deuxième partie) = 910 souris.

Nous respectons le concept des 3R Remplacer, Réduire et Raffiner. La complexité des mécanismes biologiques mis en jeu, notamment l'interaction entre le système nerveux central et la périphérie, oblige à utiliser un modèle animal car il n'existe pas à l'heure actuelle de technique de remplacement permettant d'étudier ces interactions. En minimisant au mieux le nombre d'animaux nécessaires pour obtenir des résultats concluants et atteindre une signification statistique, nous estimons que pour mener à bien notre projet il nous faudra des groupes expérimentaux de 20 souris pour les groupes véhicules et de 45 souris pour les groupes recevant le DSS dans l'eau de boisson. Ce dernier effectif se justifie par la nécessité de séparer les animaux vulnérables des animaux résistants et avoir une puissance statistique suffisante. Afin de réduire au maximum la souffrance causée aux animaux, nous avons déterminé avec attention les points limites du projet, nous permettant le cas échéant, d'administrer un traitement de confort aux animaux, voire de les sacrifier si leur état ne s'améliore pas. Des carrés de coton ainsi que des igloos en carton seront placés dans chaque cage, afin d'enrichir leur environnement, réduire leur stress et optimiser leurs conditions d'élevage. L'expérience nécessite un total de 910 souris sur trois ans. Tous les animaux seront sacrifiés à la fin de l'étude comportementale pour prélever les tissus afin de réaliser analyses ultérieures. Toutes les procédures de sacrifice et de prélèvements seront réalisées sous anesthésie.

L'objectif à long terme de ce projet est de transférer les connaissances acquises chez le rongeur à l'homme pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à améliorer l'état des patients dépressifs résistants aux traitements actuels.

15759 Le cancer reste parmi les premières causes de décès dans le monde. L'évaluation des nouvelles thérapies disponibles aujourd'hui nécessite le développement des modèles pertinents, représentatifs de la tumeur humaine. Les xénogreffes obtenues à partir de l'implantation des tumeurs humaines sur souris sont actuellement parmi les modèles les plus proches des tumeurs des patients et permettent la réalisation d'études pharmacologiques dont le potentiel prédictif

clinique est très élevé. Ainsi elles constituent un outil primordial pour tester l'efficacité de nouveaux médicaments ou encore de nouvelles combinaisons ou schémas d'administration de médicaments.

Ces essais précliniques peuvent avoir différents objectifs déterminer le type tumoral qui présentera le plus de bénéfice au traitement, déterminer les combinaisons et les fréquences d'administration qui seront les plus efficaces mais également effectuer des études moléculaires de la tumeur qui permettront d'explicitier le mécanisme d'action des molécules testées ou encore les mécanismes de résistance de ces tumeurs par rapport à ces thérapeutiques. Ces essais précliniques sont des phases préliminaires aux phases cliniques. Ils permettent d'orienter les développements futurs des nouvelles molécules et d'optimiser des traitements qui seront ensuite utilisés chez l'homme

Les modèles de xénogreffes de notre laboratoire se répartissent en plusieurs types tumoraux (sein, côlon, poumons, ovaire,). Ces tumeurs représentent la diversité de la maladie chez l'homme et sont mises à la disposition des partenaires avec lesquels nous collaborons pour évaluer des nouvelles drogues.

L'évaluation de l'effet de ces molécules comprend l'étude de la tolérance qui permet de déterminer la dose des molécules ou des associations de molécules sur de petits groupes d'animaux jusqu'à l'étude de l'efficacité anticancéreuse de ces mêmes molécules.

Nous basant sur notre activité de plateforme, nous pouvons envisager l'utilisation de 19005 souris en 5 ans, ceci correspondant à l'évaluation d'environ 30 molécules seules ou combinées entre elles sur 80 modèles. Ce nombre est réduit au minimum tout en assurant une puissance statistique significative des résultats obtenus. Ces animaux seront utilisés dans le respect des règles de raffinement exigées et les différentes procédures seront mises en œuvre de façon à engendrer le minimum de contraintes et de douleur (utilisation d'anesthésique, et d'analgésique et arrêt de l'expérience en respect des points limites définis préalablement tels que la taille des tumeurs, la perte de poids...)

L'utilisation d'animaux vient ici en complément à des études *in vitro* sur cultures de cellules tumorales réalisées au préalable, et permet la compréhension de l'effet de nouvelles molécules ou les associations de molécules sur un système intégré. Cela ne peut, pour le moment, pas être remplacé par des études autres que sur l'animal.

15760 L'insuffisance cardiaque (IC) a longtemps été associée à une altération à la fois de la contraction et de la relaxation du cœur (ventricule gauche). En fait, il est apparu récemment que la moitié des patients en IC ont une contraction normale, mais une relaxation détériorée. Cette forme d'IC dite « à Fraction d'Ejection préservée (ICFep) » est une entité à part entière difficile à diagnostiquer et à soigner. Nous avons montré des effets cardiovasculaires bénéfiques du riz de Camargue diminution du cholestérol, prévention de l'hypertension Nous voulons étudier les effets de différents riz (brun, rouge, noir) sur un modèle expérimental d'ICFep, induit par intervention chirurgicale chez le rat, qui reproduit la pathologie humaine. Les résultats permettront de tester et documenter un effet préventif, voire thérapeutique, de ces riz dans l'ICFep. Une telle étude n'a jamais été réalisée. La partie expérimentale de l'étude est basée sur l'utilisation (sur 3 ans) de 120 rats mâles adultes répartis en 8 groupes. Nous respecterons la règle des 3R. Nous avons organisé nos expériences au mieux pour Réduire le nombre d'animaux nécessaires à l'acquisition des données. Chaque animal sera utilisé, après sacrifice selon les règles en vigueur, pour mesurer tous les effets à évaluer (physiologiques, histologiques, biochimiques et moléculaires). Nous avons Raffiné nos approches pour réduire au strict minimum la détresse imposée aux animaux, avec la détermination de points limites identifiés. L'intervention chirurgicale, consistant à pratiquer une constriction aortique trans-abdominale, est réalisée sous anesthésie et analgésie pré et post opératoires. Aucune alternative basée sur des approches in-vitro ne peut actuellement mimer l'ICFep. Si une telle alternative était identifiée pendant la réalisation de nos travaux, nous Remplacerons notre stratégie immédiatement. Les rats seront hébergés dans un milieu permettant de répondre à leurs besoins physiques et comportementaux (enrichissement du milieu) et une grande attention sera accordée au suivi de leur santé et de leur bien-être au cours du protocole.

15761 L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une maladie caractérisée par une augmentation de la pression dans les artères qui relient le cœur aux poumons (artères pulmonaires) aboutissant à une insuffisance du cœur droit. C'est une maladie difficile à diagnostiquer avec une évolution rapide et fatale. L'HTAP peut être liée à des maladies inflammatoires/auto-immunes, des prédispositions génétiques ou sans aucune cause apparente (idiopathique). Dans le cas de la forme héritable, cette maladie est majoritairement liée à des mutations dans un gène spécifique appelé BMPR2. Les patients portant une mutation dans ce gène présentent une pression artérielle pulmonaire (PAP) plus élevée par rapport aux non-mutés. De plus, l'hypoxie (diminution de la quantité d'oxygène que le sang distribue aux tissus) semble être un facteur aggravant entraînant une augmentation de la PAP chez ces patients.

Dans ce projet, une lignée de rats génétiquement modifiée pour une mutation du gène d'intérêt sera utilisée. Ces rats ont un développement de la maladie similaire aux patients porteurs de la mutation. Notre but est d'étudier les effets de la mutation au niveau du cœur droit chez des rats qui n'ont pas encore développé la maladie. Compte tenu que l'hypoxie est un facteur altérant la pression artérielle pulmonaire, des rats génétiquement modifiés seront exposés à une diminution de la quantité d'oxygène. Il sera également étudié l'impact de la mutation d'intérêt sur des rats présentant une hypertension artérielle pulmonaire sans cause apparente induite par une injection de monocrotaline (composé chimique conduisant à un remodelage du cœur droit et des vaisseaux ainsi qu'une inflammation à la périphérie des vaisseaux).

Les rats seront analysés par des techniques d'imagerie par résonance magnétique (IRM) *in vivo* qui permettent d'étudier le fonctionnement du muscle cardiaque. Ce modèle de rats transgéniques pourrait permettre la mise en évidence des marqueurs biologiques par IRM cardiaque avant l'apparition de la maladie. Les méthodes d'IRM développées dans ce projet pourraient être transposées chez l'Homme pour établir un diagnostic précoce de la maladie.

Dans le cadre de la mise en place de la règle des 3R et dans un souci permanent de garantir le bien-être des animaux, ceux-ci seront manipulés par des personnes compétentes et formées. Les mesures de RAFFINEMENT sont mises en place à toutes les étapes du projet, notamment au cours de l'hébergement (cage collective, litière et enrichissement adaptés). Afin d'éviter toute souffrance, les animaux seront anesthésiés quand nécessaire et des points limites seront déterminés afin d'interrompre le protocole en cas d'apparition de signes de détresse.

Compte tenu du diagnostic difficile et du mauvais pronostic de l'hypertension artérielle pulmonaire, une meilleure compréhension des mécanismes de cette maladie passe obligatoirement par l'étude des modèles animaux, cette étape est essentielle et ne peut être REMPLACÉE par d'autres techniques.

Dans un souci permanent de diminuer le nombre d'animaux utilisés (REDUCTION), le caractère non invasif de l'IRM *in vivo* permet de réaliser des méthodes d'analyse complémentaires sur les mêmes animaux (mesure de la pression artérielle pulmonaire, électrocardiogramme). Dans ce projet, 162 animaux seront utilisés, ce nombre est le nombre minimal nécessaire afin d'obtenir des résultats statistiquement fiables.

15762 L'ostéoporose est une maladie caractérisée par une diminution de la quantité et de la qualité de l'os. Elle affaiblit le squelette et augmente le risque de fractures, particulièrement au niveau de la colonne vertébrale, du poignet, de la hanche, du bassin et de l'épaule. L'ostéoporose et les fractures qui en résultent sont une cause importante d'infirmité et de morbidité.

Nous pensons que la nacre pourrait permettre de réduire la perte de masse osseuse due à l'ostéoporose. La nacre est une substance naturelle très bien tolérée par l'organisme humain, contrairement aux thérapies actuelles anti-ostéoporotiques qui présentent des effets secondaires. Elle pourrait donc être une alternative à ces médicaments. La nacre est composée à 97% de carbonate de calcium (CaCO₃) sous forme d'aragonite et de 3% de composés organiques (chitine, polysaccharides, protéines, peptides, lipides).

En plus de l'apport calcique de la nacre, celle-ci contient des composés actifs, qui pourraient avoir un rôle dans la prévention de la perte osseuse.

Des résultats préliminaires ont montré chez des souris âgées de 22 mois qu'une administration orale de nacre par gavage pendant un mois augmentait la densité osseuse. Cette étude a été réalisée sur n=10 par groupe. Cependant, dans cette étude du fait de l'âge des souris le métabolisme osseux est extrêmement ralenti, ce qui limite l'effet de la nacre observable.

Nous souhaitons réaliser un projet avec la nacre cette fois-ci administrée directement dans la nourriture et non par gavage. De plus nous souhaitons étudier l'effet de la nacre sur la perte osseuse induite par l'âge en modifiant l'alimentation des souris pendant trois mois pour les souris entre 17 et 20 mois.

Nous proposons de faire ce projet pour évaluer les paramètres osseux en 2 parties, l'une avec une histologie standard en coupes fines et l'autre avec une histologie en coupes épaisses transparisées. Celle-ci nous permettra, après l'injection temporelle de marqueurs osseux et interstitiels fluorescents, de valider une nouvelle procédure d'évaluation des paramètres osseux et cellulaires pendant la croissance et leur évolution après le traitement.

Afin de mener à bien ce projet, 72 souris femelles matures sur le plan squelettique âgées de 17 mois seront nécessaires. L'étude comprend un groupe "contrôle" (nourriture standard) de 24 animaux, et 2 groupes de 24 animaux par groupe (complémenté CaCO₃ - complémenté poudre nacre).

Les dispositions prises pour l'application de la règle des 3R seront les suivantes

- « Réduire » le nombre d'animaux en expérimentation

Pour nos expérimentations, nous avons prévu le nombre nécessaire d'animaux afin de garder une puissance statistique dans le traitement des résultats, et conclure avec les résultats de la première étude sur la réalisation ou non de la deuxième étude.

- « Raffiner » la méthodologie utilisée, ce qui implique la notion de points limites (critères d'interruption). Nous allons porter une attention particulière au bien-être des animaux. Le suivi quotidien des animaux permet d'identifier des signes de souffrance caractérisés par l'état du pelage, le comportement (agressivité / apathie), cris, mobilité, alimentation etc. Le poids corporel sera mesuré tous les deux jours. Dans le cas où un animal présenterait des signes manifestes de souffrance ou perte de poids excessive ($\geq 20\%$ du poids initial), il sera sorti des procédures expérimentales.

Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité, par du personnel qualifié, pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. La douleur est rigoureusement contrôlée grâce à des points limites évalués en amont. Par ailleurs, les animaux sont hébergés dans un environnement enrichi (copeaux, bâtonnets à ronger). De plus, une grille d'évaluation du bien-être animal sera utilisée au cours du projet, en même temps que le suivi de poids.

Nous avons choisi de faire réaliser à façon un aliment comprenant l'ingrédient, que nous souhaitons tester, afin de remplacer le gavage par de l'alimentation « ad libitum ».

Enfin, l'eau et la nourriture sont mises à disposition "ad libitum" et de la musique est diffusée en salle d'hébergement pour diminuer le stress et atténuer les bruits environnementaux.

- « Remplacer » les modèles animaux

Nos questions scientifiques sont centrées sur les effets l'ajout d'un composé alimentaire, à des concentrations sans danger pour l'animal, sur la physiologie du système osseux et vasculaire intra osseux. Les expérimentations animales avec une physiologie intégrée sont donc primordiales. Des modifications engendrées au niveau de l'organisme entier, telles que les modifications liées au vieillissement, influencent la cinétique de perte osseuse. De fait, nous nous sommes orientés vers un modèle animal pertinent de vieillissement que représentent les souris âgées. Il n'existe pas de modèle cellulaire reproduisant nos procédures expérimentales.

15763 La morphine et ses dérivés (opioïdes) sont les analgésiques les plus puissants et sont fréquemment utilisés en clinique pour le traitement des douleurs sévères. Lors de traitements chroniques, ces analgésiques induisent une tolérance conduisant les cliniciens à augmenter les doses, exposant le

patient au risque d'effets secondaires graves, dont la dépression respiratoire. De plus, les opioïdes créent une addiction caractérisée par un très fort taux de rechute. Les méthodes alternatives actuelles sont insuffisantes donc, pour mieux traiter la douleur avec des opioïdes ou ses dérivés, il est nécessaire d'étudier davantage les mécanismes qui conduisent à la tolérance et à l'addiction.

Ce projet vise à mieux comprendre les phénomènes de tolérance aux opioïdes chez la souris à l'aide d'une technique d'imagerie à ultrasons fonctionnels (fUS).

Nous avons comme objectif la validation d'un marqueur cérébral permettant la détection de la tolérance. Ce projet implique une étude intégrée de modifications cérébrales et comportementales en réponse à des opioïdes et, de ce fait, ne peut être réalisé que sur un modèle animal. La souris est un modèle de choix pour l'étude des phénomènes d'addiction car le génome est accessible pour des modifications génétiques nécessaires à notre projet. Le nombre total de souris nécessaire à la réalisation de ce projet est de 300 pour une durée de 3 ans. Pour réduire le nombre d'animaux, nous avons estimé la taille des échantillons permettant une analyse statistique efficace des résultats grâce aux données collectées au cours d'expériences précédentes et nos hypothèses de travail seront testées de façon séquentielle.

Ce projet met en jeu des procédures chirurgicales, l'administration de substances à action psychotrope et une technique d'imagerie du flux sanguin cérébral basée sur des ultrasons. Pour éviter toute souffrance, les procédures de chirurgie se feront sous analgésie et anesthésie générale. Les séances d'imagerie seront réalisées sur animal vigile dont la tête sera immobilisée mais dont le mouvement des pattes ne sera pas entravé; des séances d'habituation seront effectuées au préalable. Les souris seront observées quotidiennement. Une grille précise d'évaluation des points limites sera utilisée. Tout signe de douleur, souffrance, angoisse ou stress chez les animaux sera soulagé avec des analgésiques. Ce projet de recherche fondamentale a pour but de découvrir des marqueurs biologiques de tolérance aux opioïdes, ainsi que d'identifier des facteurs pronostiquant la réponse thérapeutique aux traitements de substitution ouvrant ainsi la voie vers de nouvelles stratégies pour traiter la douleur.

15764 Le cancer du pancréas est la quatrième cause de mortalité dans le monde. Asymptomatique et métastatique, il n'existe à l'heure actuelle aucun moyen de dépister cette pathologie à un stade précoce et l'espérance de vie du patient excède rarement 6 mois. L'urgence à laquelle la recherche est confrontée nous a amenés à rechercher le rôle de différentes voies qu'emmène à cette maladie.

Nupr1 La protéine Nupr1 (aussi connue sous le nom de Candidat Of Metastasis, Com1, ou p8) est fortement induite en réponse à nombreux facteurs de stress dans la plupart de tissus, y compris dans le cancer du pancréas. Le gène Nupr1 semble avoir un rôle clé dans la biologie de la tumeur, car son expression semble indispensable pour que les cellules tumorales puissent survivre dans un environnement hostile et ainsi permettre la formation de métastases. Notre laboratoire a montré que Nupr1 est également nécessaire pour la formation des lésions pré-tumorale. Plusieurs études ont démontré que l'expression de NUPR1 est rapidement et significativement induite par le stress du réticulum endoplasmique (RE), une organelle cellulaire destinée à l'assemblage des protéines après synthèse. Notamment, dans plusieurs études *in vitro*, l'expression de plusieurs protéines est supprimée lors de la suppression de Nupr1. Ces protéines sont strictement corrélées avec le développement du cancer et des mécanismes de suppression de cellules cancéreux.

Les régimes riches en graisses favorisent la stéatose (accumulation de graisse dans le foie) et l'inflammation ces deux conditions peuvent augmenter les risques de développement le cancer du pancréas et du foie. Nous essayons d'étudier les effets de NUPR1 dans ces conditions sur des souris NUPR1 KO (génétiquement modifiée qui ne exprime pas NUPR1). Nos études préliminaires sur de cellule de cancer NUPR1 KO ont démontré que l'inactivation de NUPR1 favorise la mort cellulaire en couplant ER-stress avec la nécrose cellulaire. Dans ce cadre, nous émettons l'hypothèse que l'inhibition pharmacologique de la protéine NUPR1, peut réduire le stress et l'inflammation causé par différentes causes environnementales comme par exemples la consommation élevée de graisses et améliorer les conditions pancréatiques et hépatiques. Ce projet a non seulement le potentiel de disséquer les voies moléculaires sous-jacentes au stress environnemental mais il pourrait également ouvrir la voie à de nouveaux traitements thérapeutiques

pour des conditions dans lesquelles une alimentation malsaine peut exacerber le risque de cancer du pancréas et du foie.

Notre projet vise donc à étudier l'influence de NUPR1 sur le stress du réticulum lié aux stress environnementaux. Le protocole que nous proposons peut nous permettre de voir (i) si les souris NUPR1 KO sont ou pas moins susceptibles à l'établissement d'un syndrome métabolique et inflammatoire qui prédispose à la stéatose hépatique (corrélé avec le cancer du pancréas) suite à l'administration d'un régime riche en graisse (60% graisse) ou HFD (High Fat diet) (ii) si les souris NUPR1 KO sont moins susceptibles à l'induction du stress du réticulum après injection intra-péritonéale de Tunicamycin (1.5 microgram/g, dose très faible) (iii) si il y a des différences microscopiques entre la morphologie structurale des souris NUPR1 KO et WT soumis à régime gras et avec régime normale.

Pour ce projet nous avons évalué le nombre minimum d'animaux à 48 (8 groupes de 6 souris). Nous avons estimé des expériences simple afin de préserver le bien-être des animaux et en même temps pour induire efficacement le stress du réticulum. Nous mettrons entre 4 et 6 souris par cage (52x30x20cm) accompagné d'un enrichissement le "diamond twist". Comme dit précédemment, les procédures utilisées ne compromettent pas le bien-être animal.

Dans ce projet la règle des trois R sera mise en place.

Mesures prises pour le respect de la règle des 3R seront les suivantes

1-Réduire le nombre d'animaux six souris par groupe; de plus, en cours de protocole, le nombre d'animaux par groupe a été réduit au maximum sans toutefois compromettre l'analyse statistique des résultats décision d'utiliser uniquement des souris mâles qui répondent mieux au régime HFD

2-Raffiner le protocole tient compte du respect des points limites. Une surveillance adaptée des animaux permettra de limiter l'apparition d'une souffrance ou d'une atteinte de l'état général de l'animal. En cas d'atteinte de ces points limites les animaux seront sortis de l'étude et mis à mort.

Nous mettrons entre 4 et 6 souris par cage (52x30x20cm) accompagné d'un enrichissement le "diamond twist" et aussi des tubes en papier et du coton ou paille pour réduire le stress

3-Remplacer pas possible dans le cadre des études physiologiques *in vivo*

15765 Chaque étude de ce projet a pour objectif principal d'étudier la stabilité et le devenir d'une molécule, candidat-médicament, dans le tractus gastro-intestinal après administration chez le miniporc. Le devenir de cette molécule et le potentiel immunogénique peuvent être étudiés dans différents tissus ou liquides biologiques. Dans le cadre de ce projet, un suivi de la molécule dans le contenu intestinal, dans les selles et dans le sang sera réalisé.

Pour suivre l'évolution de la molécule testée au cours du processus de digestion dans le tractus intestinal, son élimination dans les selles au cours du temps et les propriétés immunogéniques, des recueils de contenu intestinal et de selles seront réalisés chez le miniporc pendant une ou plusieurs périodes après l'administration du candidat-médicament.

Ces recueils seront ensuite traités et analysés pour mesurer la stabilité, la diffusion et l'élimination du candidat-médicament administré et/ou de ses métabolites et la production d'anticorps. Plusieurs administrations pourront être effectuées sur un même animal en respectant une durée minimale de 72 heures de récupération entre 2 administrations, ce qui permet de raffiner l'expérience.

Le nombre prévisionnel maximum d'animaux est de 100 miniporcs sur 5 ans.

La conception de ce projet prend en compte la règle des 3R.

Remplacement Dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez le miniporc car il n'existe pas de méthode de substitution (*in vitro* ou *in silico*) pour évaluer le devenir d'une molécule dans le tractus gastro intestinal et son potentiel immunogénique. Or, avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité, la toxicité et la pharmacocinétique d'un candidat médicament. A ce jour, le miniporc est l'une des espèces de non-rongeurs qui est la plus adaptée à ce type de modèle d'étude car, de par ses nombreuses similitudes physiologiques et anatomiques avec l'homme et son régime alimentaire omnivore, les propriétés du tractus digestif du miniporc sont proches de celles de l'homme.

Réduction Un nombre minimal et suffisant d'animaux par groupe est utilisé afin d'analyser de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et d'effectuer des analyses statistiques.

Raffinement dans ce projet, le raffinement est obtenu par

- le recours à des procédures les moins invasives possibles
- le suivi d'éventuels signes cliniques
- la détermination des points limite
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire
- un protocole analgésique adapté pour la chirurgie et la période post-opératoire et un suivi post-opératoire de l'état de santé des animaux avec des soins et un enrichissement adapté afin de permettre une bonne récupération des animaux
- la réduction du volume sanguin prélevé grâce à l'amélioration de la sensibilité des méthodes d'analyse
- la familiarisation des animaux aux procédures expérimentales.

15766 Le cancer du poumon est une cause majeure de décès dont le taux de survie globale à 5 ans n'est que de 15%, ce qui en fait le cancer le plus meurtrier au monde avec plus de 1,8 millions de patients qui en décèdent chaque année. Malgré les progrès récents et la mise en place de stratégies thérapeutiques innovantes et ciblées, visant à éradiquer spécifiquement les tumeurs pulmonaires, il est indispensable de mieux comprendre le développement de ce cancer en mettant en place de nouvelles approches novatrices pouvant mener à une stratégie thérapeutique alternative.

La mitochondrie est une organelle dynamique essentielle qui fournit l'énergie nécessaire à différents processus cellulaires clés, tels que la survie, la prolifération et la migration. Les mitochondries permettent une adaptation cellulaire aux stress environnementaux, tels que la privation en nutriments et en oxygène, qui vont conduire à son dysfonctionnement, étape clé dans la perte de viabilité cellulaire. Cependant, une des caractéristiques des cellules tumorales est leur habilité à échapper à la mort, et à s'amplifier de façon incontrôlée. Pour y parvenir, ces cellules ont mis en place un système de protection consistant à éliminer spécifiquement les mitochondries qui ne sont plus fonctionnelles par un processus appelé mitophagie, permettant ainsi de ne conserver que des mitochondries saines et fonctionnelles, et ainsi favoriser la survie des cellules cancéreuses. Ainsi, la mitophagie joue un rôle essentiel dans la survie des cellules de cancer du poumon *in vitro*, et participe à la régulation de la réponse inflammatoire, que l'on sait être un acteur clé de la progression tumorale. Toute réponse inflammatoire repose sur le recrutement et l'activation des cellules du système immunitaire qui sont des médiateurs importants et nécessaires de ce processus.

Ainsi, une meilleure compréhension du rôle de la mitophagie dans la tumorigenèse permettra selon nous d'ouvrir la voie à de nouvelles perspectives thérapeutiques plus efficaces pour traiter les cancers du poumon chez l'homme.

L'objectif de notre projet de recherche a pour but de définir le rôle du processus par lequel les cellules cancéreuses éliminent spécifiquement les mitochondries endommagées dans le développement du cancer de poumon et la réponse aux traitements chimiothérapeutiques. Ce projet est soutenu financièrement par des organismes de recherche publics.

Les mécanismes de cancérisation à l'œuvre chez la souris sont très proches de ceux observés chez l'humain, ce qui en fait un modèle de choix pour l'étude de ces mécanismes d'autant que l'on dispose chez la souris de nombreuses possibilités d'analyses au niveau cellulaire et moléculaire. Ce projet fait appel à des lignées de souris génétiquement modifiées qui ne présentent pas de phénotype dommageable. Il implique également des modèles murins expérimentaux d'allogreffes qui sont bien caractérisés et modélisent fidèlement la pathologie humaine, que nous soumettrons à des traitements médicamenteux pour voir leur efficacité, et le lien avec la mitophagie des cellules tumorales. Toutefois, nous nous intéressons à des stades précoces du développement tumoral et toutes les procédures menées avec ce modèle seront interrompues avant l'apparition de signes cliniques douloureux pour les animaux. D'autres interventions telles qu'injection et prélèvement

sous anesthésie sont prévues. Assortie des mesures de réduction et de raffinement prévues qui limitent la sévérité des procédures, l'ensemble des dommages causés aux animaux sont estimés acceptables au regard des bénéfices escomptés de ce projet pour la santé humaine.

Le cancer du poumon est une pathologie complexe où les cellules cancéreuses interagissent étroitement avec le microenvironnement pulmonaire, et notamment les cellules immunitaires infiltrant la tumeur. Ainsi, il n'existe pas à ce jour d'autre alternative que l'utilisation des souris pour l'étude *in vivo* des mécanismes moléculaires impliqués dans la tumorigénèse.

Bien qu'il n'existe à ce jour pas de méthode de remplacement pour réaliser ces études, il est évident que nous sommes très vigilants à minimiser et à optimiser le nombre d'animaux utilisés dans nos expériences. Nous avons réalisé une étude statistique préalable de façon à définir de façon adéquate le nombre d'animaux strictement nécessaire pour répondre clairement à notre question scientifique en garantissant la justesse des résultats obtenus. En termes de réduction, nous utiliserons, lorsque l'expérimentation le permet, indifféremment les mâles et les femelles. Par ailleurs, des études préalables *in vitro* permettent de sélectionner des gènes d'intérêt afin de réduire le nombre tester *in vivo*. Enfin, l'ordre de réalisation des procédures servira à comparer différentes conditions afin de sélectionner la plus efficace pour réduire le nombre d'animaux utilisés dans certaines procédures.

Une grande importance sera accordée au bien-être des animaux. Les animaux sont hébergés en groupe avec un milieu enrichi. Le recours à l'anesthésie lorsque nécessaire et la mise en place de points limites précoces et adaptés à chaque procédure, basés sur une observation détaillée des animaux au cours de chaque procédure permettront de limiter la sévérité de celles-ci. L'utilisation de modèle génétiques inductibles nous permet par ailleurs de maîtriser le développement de la pathologie, et donc suivre au plus près les animaux de façon adéquate.

Cette étude utilisera au maximum 4872 souris sur 5 ans.

15767 Notre système immunitaire nous protège contre les infections. Il est capable, selon les signaux de danger qu'il reçoit, de choisir la réponse optimale pour lutter contre un virus, un parasite, un champignon ou une bactérie. Parfois, notre système immunitaire ne reçoit pas les bons signaux de danger. Dans ces situations, il n'arrive pas à éliminer le microbe. C'est le cas des infections virales persistantes comme l'infection VIH-1. Parfois le système immunitaire réagit beaucoup trop fortement contre un virus tout en mettant en place une réponse qui n'est pas la bonne. C'est le cas des patients qui ont développé une forme grave de covid-19 (maladie provoquée par le virus SARS-CoV-2) ou de ceux qui en sont décédés.

L'objectif de la vaccination est d'introduire dans l'organisme des morceaux de microbes pour stimuler la réponse immunitaire vers la voie la plus efficace et ainsi aider notre système immunitaire à éliminer le pathogène.

Dans cette étude nous nous proposons de tester en priorité 3 vaccins anti-SARS-CoV-2, puis 3 vaccins anti-VIH-1 et enfin 2 vaccins anti-Nipah. Les vaccins seront injectés soit par voie intrapéritonéale, soit par voie intra-musculaire ou encore par voie intranasale. L'objectif ici est de sélectionner le meilleur vaccin pour chaque infection et la meilleure voie d'administration c'est-à-dire celle qui permettra d'activer la réponse immunitaire la plus forte à la fois dans le sang, les muqueuses et les poumons (dans le cas de l'infection induite par le SARS-CoV-2). Ces travaux nécessiteront l'utilisation de 8 animaux par vaccin testé et par procédure (avec 3 procédures expérimentales) et de deux groupes d'animaux contrôles par procédure.

Ce travail sera réalisé dans le respect de la règle des 3 R.

Remplacer Les vaccins que nous allons tester dans ces modèles animaux ont été présélectionnés sur la base de plusieurs tests *in vitro* sur des cellules en culture. Ainsi seuls les vaccins candidats qui auront donné les meilleurs résultats seront ensuite utilisés chez l'animal. Avant d'être utilisés chez l'homme, il est primordial de tester leur innocuité et leur efficacité dans des modèles animaux. En effet, les réponses immunitaires sont des processus complexes dont la mise en place est conditionnée par des interactions dynamiques impliquant de nombreux partenaires cellulaires présents dans différents compartiments de l'organismes A l'heure actuelle, aucune approche *in vitro*

ne permet de reproduire de façon satisfaisante l'ensemble des phénomènes impliqués dans l'initiation des réponses immunitaires dans le cadre d'une infection naturelle ou après une vaccination. C'est pourquoi nous avons besoin de travailler avec ces modèles animaux.

Réduire La variabilité interne de chaque modèle est connue, ce qui a permis de définir avec précision le nombre d'animaux nécessaires à l'étude. La structure expérimentale (définition des lots) introduira un appariement des données par l'expérience, l'expérimentateur et la fratrie des souris. Ces appariements augmentent la puissance statistique des tests employés et réduisent ainsi le nombre d'animaux nécessaires. La réduction du nombre d'animaux est également possible dans ce projet grâce à l'utilisation de méthodes très sensibles de mesure qui permettent de diminuer l'échantillonnage nécessaire et donc in fine le nombre d'animaux.

Raffiner Les souris sont élevées avec soin et respect, en présence d'éléments d'enrichissement (bandelette de papier pour faire un nid et un tunnel en carton pour se réfugier et jouer). Les animaux sont toujours manipulés par une personne expérimentée. Les animaux seront anesthésiés avant l'injection des vaccins et au moment du prélèvement sanguin. Les animaux ne devraient pas être en situation de souffrance ou d'inconfort au cours de ce projet. Ils seront toutefois observés 2hrs après chaque injection puis quotidiennement. Bien que ce ne soit pas attendu, une prostration, une excoriation ou toiletteage intensif sur le(s) site(s) d'injection seront les premiers signes d'une douleur anormale liée au modèle. Dans ce cas, une analgésie de tous les animaux sera effectuée.

Le nombre total d'animaux nécessaires à la réalisation de cette étude sur 5 ans sera de 672.

15768 Les synéchies intra-utérines demeurent une cause importante d'infertilité et surviennent essentiellement après un traumatisme mécanique, infectieux ou obstétrical de l'endomètre. Il s'agit d'un accolement des parois de l'utérus dû à une mauvaise cicatrisation suite à une intervention chirurgicale comme un curetage ou une résection de fibrome. Elles sont notamment responsables d'une fausse couche sur cinq.

L'hystérocopie opératoire constitue, dans les pays développés, l'une des causes principales de synéchies intra-utérines, rapportées après résection de polype, de myomes ou de cloison. Leur apparition peut être prévenue par application d'un gel antiadhérentiel qui agit comme une barrière pour éviter l'accolement des parois de l'utérus pendant la cicatrisation. Ces produits sont classés dispositifs médicaux et doivent donc faire l'objet d'un marquage CE impliquant l'évaluation de leur biocompatibilité (normes découlant de la norme ISO 10993-1) mais également de leur efficacité. C'est dans ce cadre de démonstration de l'efficacité de ces dispositifs médicaux que se situe ce projet.

Le nombre total d'animaux utilisés dans ce projet est de 24 rats femelles (animaux âgés de 7-8 semaines au démarrage de l'étude).

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'efficacité anti-adhérentielle d'un dispositif médical dans un modèle de synéchies intra-utérines chez la ratte.

Principe du test : implantation du dispositif médical dans le modèle de synéchies intra-utérines et comparaison de l'efficacité anti-adhérentielle du dispositif versus un groupe contrôle ne recevant pas de traitement anti-adhérentiel (possibilité également de comparer le nouveau dispositif à un dispositif déjà commercialisé).

Performance attendue : Absence ou diminution des synéchies post-opératoires.

A partir de ce modèle, il est donc possible d'évaluer l'efficacité d'une implantation intra-utérine d'un dispositif médical. Un groupe de rat reçoit le dispositif médical après induction de synéchies et un groupe de rat reçoit uniquement l'induction de synéchie sans traitement. La comparaison de l'apparition et de l'importance des synéchies dans les deux groupes permet d'évaluer l'efficacité du traitement.

Remarque : il est possible d'ajouter un groupe avec un dispositif de référence dont les propriétés sont déjà connues (dispositif déjà commercialisé) afin d'évaluer le bénéfice du nouveau dispositif médical.

Les mesures suivantes sont mises en place afin de réduire la douleur pendant la procédure expérimentale :

Avant la chirurgie, les animaux reçoivent une injection sous-cutanée d'un analgésique (buprénorphine) et d'un anti-inflammatoire (méloxicam). L'anesthésie est réalisée par inhalation d'un mélange d'O₂-Isoflurane à l'aide d'un masque. La fréquence cardiaque et la saturation en oxygène sont surveillées et l'animal est placé sur un tapis chauffant. Un anesthésique local peut être utilisé après la chirurgie pour une meilleure récupération des animaux (Lidocaine). Les animaux sont surveillés jusqu'à leur réveil, puis retournés dans leurs cages respectives. Au niveau du suivi post-implantatoire, une injection sous-cutanée de buprénorphine est effectuée en fin de journée puis deux fois par jour pendant 3 jours - extension du traitement en cas de signes de douleur.

Le nombre d'animaux est réduit au minimum, de manière à avoir suffisamment de sites de traitements pour que les analyses histologiques soient exploitables.

Par ailleurs, les points limites suivants ont été définis et conduisent à une décision d'euthanasier l'animal pour éviter toutes souffrances inutiles

- Signes observés seuls amenant à une euthanasie de l'animal convulsions (continues pendant 15 minutes chez le rat et sans durée minimale chez le lapin), vocalisations continues pendant plus d'une minute en l'absence de contention, perte de poids $\geq 20\%$ sur 72 heures, hémorragie importante, existence d'une plaie ouverte au niveau du site d'implantation qui ne se refermerait pas malgré les soins apportés.

- Signes en association pouvant amener à une décision d'euthanasier l'animal cyanose, gasping, piloerection + prostration, animal conscient (réagissant à la stimulation) mais incapable de bouger, animal ne buvant plus et/ou ne mangeant plus, pertes d'équilibre persistantes, détresse respiratoire sévère ou persistante. En présence de ces signes, le directeur d'étude devra déterminer si des soins peuvent être apportés à l'animal (intervention d'un vétérinaire) ou si l'animal doit être euthanasié.

15769 Les plaquettes jouent un rôle clef dans l'arrêt du saignement. Elles sont également impliquées dans la thrombose artérielle. Suite à la rupture d'une plaque d'athérosclérose dans une artère malade, les plaquettes adhèrent au site de lésion, s'activent et agrègent. Elles forment un thrombus mural qui peut bloquer l'écoulement du sang et entraîner des pathologies ischémiques graves comme l'infarctus du myocarde ou l'accident vasculaire cérébral, qui représentent la première cause de mortalité dans le monde. Comprendre les mécanismes qui régulent l'adhésion et l'activation des plaquettes permettrait d'identifier de nouvelles cibles anti-thrombotiques.

Les plaquettes expriment des récepteurs d'adhérence mais également des récepteurs d'activation. Le rôle de certains de ces récepteurs reste mal compris. L'objectif de ce projet vise à caractériser le rôle du récepteur CLEC-2 dans les fonctions d'adhérence et d'activation des plaquettes. Ceci permettra de déterminer si ce récepteur pourrait constituer une potentielle cible anti-thrombotique pour limiter les accidents cardio-vasculaires.

Limitation du nombre d'animaux

Remplacement : Le but de ce projet est d'évaluer le rôle du récepteur CLEC-2 (c-type lectin-like receptor 2) dans les fonctions des plaquettes, notamment dans des processus complexes et intégrés que sont la thrombose, l'hémostase ou encore l'intégrité vasculaire. Les modèles *in vitro* ne sont pas assez sophistiqués pour reproduire toute la complexité de ces processus. De plus, les plaquettes sont des cellules anucléées qui ne peuvent être cultivées, empêchant tout modèle reposant sur la culture cellulaire.

Réduction : Le nombre d'animaux utilisés lors de cette étude est réduit au minimum, ce nombre étant fixé à 16 souris/groupe au maximum pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs. Nous utiliserons des tests de Mann-Whitney pour la comparaison de 2 groupes testés et un test ANOVA post-test Dunn pour les comparaisons multi-groupe.

Raffinement : L'utilisation de modèles d'animaux a été établie en raffinant au maximum les conditions de travail, afin de limiter leur angoisse, stress et douleur lors des manipulations. Pour ce

faire, des points limites ont été établis pour les procédures décrites. Ces points limites permettront de soustraire l'animal aux procédures expérimentales permettant de limiter la souffrance et l'inconfort de l'animal.

Pour assurer leur confort, les animaux sont hébergés dans des cages munies de particules de bois et enrichies avec un carré en coton compressé et de frisure de papier, afin de permettre aux animaux de réaliser un nid et de compartimenter leur environnement conformément à leurs besoins comportementaux.

Pour chaque procédure, les animaux sont anesthésiés, maintenus à une température de 38°C par l'utilisation d'une plaque chauffante (tout au long de la procédure) et un traitement approprié contre la douleur leur est administré.

Pendant toutes les expérimentations, les animaux sont surveillés par du personnel entraîné.

Cette étude nécessitera l'utilisation de 836 souris.

15770 Les maladies hépatiques chroniques telles que la cirrhose du foie et le carcinome hépatocellulaire (CHC) sont des défis majeurs pour la santé mondiale. Ces maladies sont souvent la conséquence d'une maladie hépatique chronique et asymptomatique évolutive. Cirrhose et CHC sont la plupart du temps dus à une infection virale par le virus de l'hépatite C ou de l'hépatite B. Au cours des dernières années un autre type d'affection s'est fortement développé. La stéato-hépatite non alcoolique (NASH), encore connue sous le nom de maladie du soda ou maladie du foie gras, est la conséquence d'une alimentation trop riche en sucre et en graisse. Ce type d'alimentation va entraîner le stockage et l'accumulation de graisses dans le foie, ce qui va conduire à une inflammation locale au sein de l'organe. Cette inflammation chronique va entraîner avec le temps le développement d'une fibrose dans 20% des cas, qui va ensuite évoluer en cirrhose et/ou CHC. Le CHC est la 3ème cause de mort par cancer dans le monde et le seul cancer à ne pas avoir régressé ces dernières années en terme d'incidence et de mortalité. Actuellement, il n'existe aucune thérapie permettant de traiter la fibrose hépatique et/ou la NASH. L'acide obéticholique (OCA), actuellement prescrit dans le traitement de la cholangite biliaire primitive, est en cours de test pour le traitement de la fibrose et de la NASH. La nizatidine (NZA), un antagoniste du récepteur H2 de l'histamine et prescrit dans certaines formes de gastrites, a également montré un effet notable pour le traitement de la fibrose et de la NASH. Récemment, nous avons développé un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre la protéine de jonction serrées claudine-1 (CLDN1). En modèle cellulaire et *in vivo* dans certains modèles de souris, cet anticorps s'est montré très efficace pour ralentir la progression de la maladie. Afin d'aller plus loin dans l'approche thérapeutique de la fibrose hépatique et de la NASH, nous proposons de tester notre anticorps anti-CLDN1 en combinaison avec l'OCA ou la NZA et de comparer ces combinaisons aux molécules seules. Afin de valider cette approche, nous souhaitons utiliser un modèle de souris au foie humanisé. Ces souris immunodéficientes sont greffées avec des hépatocytes humains, ce qui nous permet d'analyser le développement de la maladie directement dans les cellules humaines. Pour cette étude, nous estimons le nombre d'animaux nécessaire à 132 en incluant les couples reproducteurs.

Remplacer une majorité des expériences ont été menées en amont, *in vitro* sur des lignées cellulaires et *ex vivo* sur des biopsies de patients atteints de CHC, *in vivo* dans d'autres modèles murins de maladies hépatiques afin de nous assurer de la réelle nécessité de poursuivre sur ces modèles animaux greffés avec des hépatocytes humains.

Réduire nous nous basons sur la littérature et sur notre expérience en interne afin de n'utiliser que le nombre d'animaux jugé nécessaire à l'obtention de résultats exploitables.

Raffiner le protocole expérimental est planifié en amont, l'environnement des animaux est enrichi avec des tube de coton pour nidifier et des briques de tremble pour ronger, les animaux sont maintenus en groupe de 3 minimum afin d'éviter tout stress de l'animal isolé, les souris greffées auront un suivi quotidien adapté afin d'éviter toute souffrance liée à une non-prise de greffe tous les moyens nécessaires seront mis en œuvre pour éviter tout stress ou douleurs lors des procédures (anesthésie, analgésie), si besoin un analgésique dont la durée d'action s'étend au-delà de 24h est utilisé, des points limites que sont l'apparition de signes de mal être et de douleur, persistant au-

delà de 48h suite à l'injection d'un analgésique sont appliqués et une méthode de mise à mort appropriée est utilisée.

15771 Le carcinome corticosurrénalien (CCS) est un cancer rare de la glande surrénale, très agressif et de mauvais pronostic (survie à 5 ans inférieure à 35%). Il touche des sujets jeunes et reste réfractaire aux traitements conventionnels, comme la chimiothérapie, ainsi qu'aux nouvelles thérapies ciblées. La chirurgie est le traitement de référence lorsque la tumeur est localisée mais le taux de récurrence reste élevé (35%). De plus, près de la moitié des patients ne présentent pas de symptômes cliniques et sont diagnostiqués à un stade avancé parfois déjà métastatique.

L'objectif de ce projet est de développer une thérapie innovante, basée sur la correction de l'expression de microARNs manquants ou au contraire sur-représentés dans ces tumeurs. Les microARNs sont des petits ARN non codants qui régulent l'expression des gènes. Ils peuvent inhiber l'expression de plusieurs gènes à la fois, ce qui en fait des cibles thérapeutiques très prometteuses en oncologie. Notre équipe a montré dans des cultures cellulaires que certains microARNs sont impliqués dans l'agressivité du CCS, faisant d'eux de potentielles cibles thérapeutiques. Elle a également observé que leur surexpression dans les tumeurs et dans le sérum des patients est un facteur de mauvais pronostic.

L'objectif de ce projet est de développer une stratégie anti-cancéreuse novatrice basée sur l'injection de microARNs à des souris porteuses de carcinome corticosurrénalien. Les microARNs seront vectorisés dans des nanovésicules lipidiques biocompatibles. Leurs effets sur la croissance tumorale et la dissémination de métastases pourront être évalués. L'intérêt de cette approche repose sur l'adressage spécifique et sécurisé des microARNs à la tumeur en évitant leur délivrance aux tissus sains. Les nanovésicules biocompatibles présentent une excellente innocuité et sont constituées d'éléments approuvés par les autorités de régulation de mise sur le marché des médicaments. Cette approche a été testée et validée sur des cultures de cellules, qui donnent des informations cloisonnées. Il faudrait évaluer son impact au niveau d'un organisme entier. Nous avons retenu un modèle rongeur, élevé dans des établissements agréés. Seul cet animal est suffisamment connu et caractérisé génétiquement pour pouvoir nous permettre de comprendre les mécanismes mis en jeu. Le choix et le nombre de rongeurs ont été déterminés grâce aux expériences réalisées dans le cadre d'un projet antérieur. Ceci nous a permis de réduire le nombre d'animaux utilisés (1142) au minimum nécessaire pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées. Ce nombre d'animaux total est réparti sur 2 procédures de greffes différentes une greffe de cellules tumorales humaines sous la capsule rénale (modèle pseudo-orthotopique, procédure 1) ou une greffe de cellules tumorales humaines en sous-cutané (procédure 2). Les deux types de greffe seront réalisés sur des animaux anesthésiés.

Les expériences seront réalisées dans un laboratoire contrôlé pour l'absence de pathogènes. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'étude et évalué grâce à une grille d'observation clinique permettant de limiter les contraintes pour les animaux. L'utilisation de cette grille nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance des animaux. Des critères d'arrêt ont été définis afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus, pour lesquels il sera décidé de mettre en place un traitement approprié ou une euthanasie. Les animaux sont hébergés en groupe dans un milieu enrichi de maisonnettes et de carrés de coton ou papier pour faciliter la nidification.

15772 La recherche préclinique utilise des modèles animaux génétiquement modifiés qui permettent de reproduire une pathologie ou d'étudier un gène ou groupe de gène pour un processus biologique donné. Aujourd'hui, l'efficacité et la puissance de cette approche par édition de génome est très importante et a généré de nombreux modèles dans les centres de recherche. La contrainte qui émerge de cette approche est la nécessité d'évaluer pour chaque création de modèle (ou lignée) transgénique si la modification génétique entraîne une souffrance ou une douleur chez l'animal qui doit être prise en charge durant son élevage ou sa stabulation. Cette dégradation de l'état de santé de l'animal due à la modification génétique est appelée dans la réglementation européenne, un phénotype dommageable. Ce phénotype doit donc être évalué et une stratégie de prise en charge

mise en place pour soit soulager soit éviter l'apparition du phénotype entraînent la souffrance chez l'animal.

Dans notre plateau d'élevage et d'exploration fonctionnelle, nous hébergeons et élevons essentiellement des modèles de rongeurs (souris et rats) génétiquement altérés. Nous mettons donc en place des moyens pour

- Évaluer si une lignée transgénique présente un phénotype dommageable
- Si oui, le définir et mettre en place spécifiquement des mesures de prise en charge de l'animal.

Cette démarche répond à une exigence de bien-être animal dans le principe des 3R

- La réduction cette procédure d'évaluation du phénotype dommageable se fait sur un nombre restreint d'individu et durant la période d'élevage ce qui permet d'avoir des paramètres zootechniques spécifiques qui aboutissent à une meilleure gestion de la production et donc une réduction au final du nombre d'individu nécessaire pour obtenir les lots expérimentaux.

- Le raffinement Tout d'abord, pour évaluer si le phénotype est dommageable, il s'agit uniquement de méthode d'observation et non invasive qui ne génère aucune douleur à l'animal. Ensuite, la connaissance du phénotype dommageable permet de définir des points limites pour adapter l'élevage de la lignée. En fonction du phénotype le raffinement peut être à différents niveaux i) la mise en place d'un enrichissement ou d'un produit de compensation spécifique (ex aliment/boisson enrichis, litière...), ii) l'utilisation d'un traitement analgésique adapté iii) la mise à mort de l'animal avant l'apparition du phénotype dommageable. Enfin, dans certain cas, lorsque le phénotype dommageable est connu ou attendu, des évaluations et des prises en charge directement adaptées seront mises en place.

- Remplacement ce projet permet d'évaluer si le phénotype d'un animal génétiquement altéré est dommageable, le remplacement n'est donc pas applicable.

Pour notre plateau, cela représente 4900 souris et 350 rats (5250 animaux).

15773 Des systèmes de cultures, appelés « cultures associées », permettent de cultiver simultanément deux espèces végétales différentes sur la même surface pendant une durée significative. Les associations de cultures de légumineuses à graines et de céréales représentent des possibilités d'innovation porteuses d'enjeux d'avenir dans les domaines agricoles, environnementaux et nutritionnels. De plus, du fait de leur complémentarité, l'association de céréales et de légumineuses permet d'améliorer la composition en acides aminés indispensables (AAi) par rapport aux besoins, conférant à ce mélange un fort intérêt nutritionnel. Cependant, la consommation des légumineuses est souvent limitée en raison de leur contenu en facteurs antinutritionnels (FAN) diminuant la digestibilité protéique. Il devient alors nécessaire de développer de nouveaux procédés de transformation limitant le contenu en FAN pour la production d'aliments destinés à l'alimentation humaine. Sur le plan nutritionnel, de nombreux travaux montrent que la germination (processus biologique commençant à l'imbibition d'une graine quiescente non-dormante et s'achevant au moment de l'émergence de l'embryon) améliore l'accessibilité aux protéines stockées dans la graine, la teneur en micronutriments et les capacités anti-oxydantes de la graine. De plus, la germination diminue le contenu en FAN dans les légumineuses, et notamment dans le pois.

L'objectif de ce projet est donc d'évaluer la qualité nutritionnelle de farines produites à partir des graines germées blé/pois issues de cultures associées en comparaison de cultures pures chez le rat en croissance. Ainsi, nous évaluerons l'impact de ces farines enrichies en protéines végétales sur la rétention azotée tissulaire ainsi que la masse et le métabolisme protéique des muscles squelettiques chez des rats en croissance. L'ensemble du projet comporte 6 procédures dont le degré de gravité va de légère à modérée pour 1 d'entre elles. Enfin la dernière procédure est classée sans réveil. Sur la base de notre expérience et en conformité à la règle des 3R, le nombre d'animaux est limité à la quantité minimale suffisante pour atteindre les objectifs. Nous utiliserons au total 132 animaux. Les animaux seront hébergés dans un environnement enrichi, adapté à l'espèce selon les normes en vigueur. Des mesures de Raffinement seront prises pour réduire la douleur, la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux. Ainsi, l'état général de l'animal sera observé quotidiennement et noté sur le cahier de suivi afin de s'assurer du bien-être des animaux.

L'expérimentateur sera informé de toutes observations anormales. Si un animal présente 3 points limites notables ou 1 point sévère selon un tableau adapté à l'étude, il sera pris une décision afin de limiter la douleur à son maximum. Le recours à des cellules en culture pour remplacer l'utilisation d'animaux de laboratoire n'est pas envisageable car des paramètres de digestibilité et des paramètres musculaires doivent être appréhendés de façon conjointe dans ce projet.

Les résultats obtenus nous permettront de mieux comprendre l'effet de ces farines germées issues de cultures associées ou non sur la prise de masse musculaire ainsi que sur le métabolisme protéique chez le rat en croissance.

15774 Notre sujet de recherche (fondamentale) est orienté vers l'étude des mécanismes contrôlant le développement du cerveau chez l'embryon. Le cerveau est composé à 80% de neurones. Le développement du cerveau se déroule en trois étapes : la génération des neurones à partir des cellules souches neuronales, la migration des neurones et leur maturation. L'objectif principal de notre travail est de comprendre comment le contrôle de la synthèse des protéines participe au développement du cerveau.

La synthèse des protéines nécessite, entre autre, la reconnaissance du code génétique (ADN) par des petites molécules adaptatrices, appelées ARN de transfert (ARNt).

Nous avons récemment mis en évidence un rôle clé des ARNt dans le développement du cerveau. Nous souhaitons désormais étudier le contenu en ARNt dans les cellules souches neuronales et les neurones à différents stades du développement du cerveau *in vivo* chez la souris. Pour cela, il nous faut isoler les cellules souches d'un côté et les neurones de l'autre, et ce, à différents stades clés du développement. Ensuite les ARNt pourront être analysés dans chaque type cellulaire. Pour isoler les cellules, nous nous appuyons sur une technologie dite FlashTag qui consiste en l'injection, dans le cerveau d'embryons de souris, d'une molécule fluorescente. En sacrifiant les animaux à des temps variés après injection nous pouvons marquer différentes populations de cellules, pour lesquelles la date de naissance correspond au stade auquel l'injection a eu lieu.

Remplacement : Le développement du cerveau a été bien décrit chez les rongeurs. Etant donné que le développement du cerveau est un continuum de 3 étapes (génération, migration et maturation des neurones), aucun modèle d'expérimentation *in vitro* ne peut mimer le caractère progressif du développement cérébral.

Réduction : Le nombre total de souris gestantes utilisées pour ce projet est estimé à 180 femelles gestantes correspondant à environ 1440 embryons manipulés. Le nombre d'expérience a été calculé au plus juste pour réduire le nombre d'animaux utilisés dans l'étude.

Raffinement : Cette expérimentation animale est rendue nécessaire pour nos travaux en regard de la complexité de la maturation corticale qui ne peut être recréée par des approches *in vitro*. Toutefois, nous gardons à l'esprit notre responsabilité de diminuer au maximum le nombre d'animaux expérimentés tout en garantissant la pertinence statistique. Nous prendrons en compte avec la plus grande attention le bien-être de nos animaux. La reproduction et l'élevage de nos animaux se font dans un environnement contrôlé permettant une réduction du stress pour l'animal. Nous limiterons le temps de manipulation à 45 minutes sur animal anesthésié. Après la chirurgie, l'animal est placé dans une cage chauffée à 35° et est surveillé jusqu'au réveil complet pour gérer toute éventuelle complication. Un anti-inflammatoire non-stéroïdien (Métacam) est ajouté à l'eau du biberon pendant 2 jours après la chirurgie. L'objectif est de prévenir toute douleur ou détresse.

15775 Les tortues marines, espèces emblématiques de la biodiversité menacée, sont des éléments structurant des écosystèmes et de la dynamique des ressources naturelles. Elles constituent ainsi une priorité majeure en termes de gestion durable et de conservation de la biodiversité. Néanmoins, les connaissances actuelles sur leur écologie sont encore très pauvres. Il est donc crucial de comprendre comment ces espèces utilisent les ressources marines au cours de leur cycle de vie, si nous voulons mettre en œuvre des mesures d'atténuation des menaces plus efficaces. L'objectif du projet est d'étudier l'écologie des tortues vertes (n=500/an), luths (n=500/an), olivâtres (n=20/an) et imbriquées (n=500/an), et leurs réponses aux turbulences océaniques et aux activités humaines.

Pour cela, nous utilisons une approche démographique par transpondage des adultes (N=7600/5 ans) et sexage des juvéniles (N=2400 / 5 ans), spatiale, comportementale et génomique, afin de comprendre comment les tortues optimisent leurs ressources dans un contexte de changement environnemental.

REMPACER Il n'est pas possible de remplacer l'utilisation de ces espèces animales protégées, le projet ayant pour objectif d'acquérir des données aidant à leur préservation. Néanmoins tout est mis en œuvre pour réduire l'impact des procédures sur le bien-être des animaux et réduire le nombre d'animaux utilisés pour ces quatre espèces de tortues marines.

REDUIRE

Le projet reposant sur l'obtention de données répétées sur les mêmes animaux cela permet de réduire considérablement le nombre d'animaux utilisés tout en augmentant la puissance statistique.

RAFFINER Tout est mis en œuvre pour réduire l'impact des procédures sur le bien-être des animaux. Les procédures réalisées sont peu invasives. Elles se limitent à la capture, aux mesures biométriques, pesées, prises de sang, biopsies, injection d'un transpondeur dans l'épaule droite (en sous-cutané) et la pose de loggers en externe. Chaque fois que nécessaire, une anesthésie locale sera pratiquée afin de réduire la douleur. Durant les manipulations des tortues, leur tête est recouverte d'un tissu sombre afin de limiter leur stress. Le temps de manipulation est réduit au maximum. Ces tortues étant des espèces protégées, si une procédure venait à impacter le comportement et le bien-être de l'animal elle serait immédiatement abandonnée.

15776 Notre projet vise à valider chez le rongeur un nouveau dispositif pour le traitement du diabète de type 1. Le diabète est une pathologie chronique majeure, grave, invalidante et en expansion liée à une concentration en glucose dans le sang (glycémie) anormalement élevée. Cette hyperglycémie a pour origine soit une absence de sécrétion de l'insuline, dans le diabète de type 1, soit une mauvaise utilisation de l'insuline par les cellules de l'organisme, aussi appelée insulino-résistance, pour le diabète de type 2. L'insuline, seule hormone hypoglycémisante de l'organisme, est sécrétée par les cellules bêta des îlots pancréatiques. C'est une maladie incurable touchant 415 millions de personnes dans le monde et qui est en expansion, avec 642 millions de cas attendus pour 2040.

La bonne gestion de la glycémie est le but principal dans la thérapie de la maladie car une hyperglycémie mène, à long terme, à l'endommagement des vaisseaux sanguins. En effet, le diabète est une des causes principales de cécité, de l'insuffisance rénale et de gangrènes des membres inférieurs dans les pays développés. Il contribue également de manière considérable aux maladies cardiaques et aux décès dus à la pathologie de cet organe.

Le traitement du patient atteint de diabète de type 1 passe obligatoirement par l'apport approprié de la dose d'insuline en injection sous-cutanée via la détermination du taux sanguin de glucose. Classiquement ceci se fait par une piqûre au bout des doigts, procédure douloureuse et très contraignante.

Au cours de la dernière décennie les dispositifs de contrôle continu de la glycémie, ont considérablement amélioré la situation. Une sonde sous-cutanée détermine le taux sanguin de glucose et permet ensuite d'adapter l'apport d'insuline, soit par injection sous-cutanée soit grâce à une pompe à insuline équipée d'un petit cathéter sous-cutané. Ce dispositif, aussi appelé « pancréas artificiel » a considérablement diminué les gestes contraignants et douloureux habituellement liés au traitement du diabète de type 1. Cependant, la sécrétion d'insuline, chez la personne saine, est la résultante non seulement de l'apport de sucre, mais également de l'apport de lipides mais aussi du stress ou de l'activité physique. Les pancréas artificiels reposent donc encore sur les ajustements patient/médecin et ne peuvent pas fonctionner de manière autonome et affectent encore grandement la vie des patients notamment au niveau social.

Tenant compte des points décrits ci-dessus, notre approche a pour but le remplacement du capteur existant par une nouvelle technologie qui peut commander une pompe à insuline. Notre dispositif implanté en sous-cutané possède l'avantage de pouvoir détecter les effets du glucose, des lipides et d'intégrer les taux des différentes hormones impliquées dans le stress ou l'activité physique pour contrôler la délivrance d'insuline.

Notre projet concerne spécifiquement la fonctionnalité de notre dispositif auprès du petit animal, étape indispensable avant les tests chez l'homme prévus en 2022.

Dans ce but, la mise en œuvre de notre dispositif nécessite une chirurgie peu invasive et la conduite de tests classiques en diabétologie comme l'administration d'insuline, de glucose ou de lipides sous anesthésie ou sous-contention ainsi que la création d'un modèle de diabète induit, suite à l'injection d'un produit chimique.

Nous prévoyons d'utiliser 40 rats au maximum pour l'ensemble de nos expérimentations.

Dans le cadre de notre preuve de concept, les dispositions prises pour l'application de la règle des 3R seront les suivantes

- Réduire : Nous utiliserons le nombre minimal d'animaux (10/conditions) qui nous permettra de réaliser tous les tests et de réaliser des tests statistiques significatifs, et si l'état des animaux le permet, ils seront utilisés pour plusieurs procédures afin de réduire le nombre total d'animaux utilisés.

- Raffiner : Une surveillance biquotidienne sera assurée par le personnel de l'équipe.

Une attention toute particulière sera apportée aux soins opératoires (anesthésique local et antalgie) et post-opératoires (réhydratation, désinfection et antalgie).

Après la chirurgie, les rats seront hébergés en cages isolés, et bénéficieront d'un enrichissement avec une hutte en carton et bâtons à ronger et quelques croquettes.

Les prélèvements sanguins à la queue se feront après application d'un anesthésique local, et seront suivies d'une désinfection et d'une réhydratation.

Pour les rats diabétiques, un contrôle quotidien de la glycémie et de leur hydratation sera mis en place.

- Remplacer : Nous avons déjà réalisé un maximum de simulations de fonctionnement de notre dispositif *in vitro*. Remplacer le modèle animal à cette étape du projet n'est pas possible pour l'établissement de la preuve de concept de notre dispositif. Celui-ci doit être confronté à des processus dynamiques du diabète qui ne peuvent pas être recréés sur des modèles *in vitro*.

15777 Notre projet cherchera à définir le rôle de l'immunité adaptative, et plus particulièrement des lymphocytes T, dans la réparation du cœur après un infarctus du myocarde. Pour cela, nous évaluerons le rôle de différentes populations de lymphocytes T dans des modèles d'atteinte cardiaque chez la souris.

Malgré l'amélioration de la prise en charge chirurgicale et médicamenteuse des patients souffrant d'un infarctus du myocarde, les conséquences à plus long terme de l'infarctus sur la fonction du cœur demeurent considérables et la mortalité reste élevée chez ces patients. La compréhension des mécanismes limitant ou favorisant l'atteinte cardiaque constitue donc un enjeu thérapeutique et sociétal majeur.

Les modèles cellulaires ne pouvant refléter la complexité de la pathologie humaine et des interactions cellulaires sous-tendant la réparation cardiaque, la souris est le meilleur modèle animal permettant d'étudier le processus inflammatoire associé à l'infarctus du myocarde. De plus, l'utilisation de souris modifiées génétiquement nous permettra d'appréhender le rôle spécifique de certaines populations de lymphocytes T. Les souris subiront un infarctus du myocarde ou une ablation d'une fraction du cœur et l'analyse consistera à étudier le nombre et le type de cellules inflammatoires infiltrant le cœur, et surtout le rôle spécifique de sous populations de lymphocytes T sur les modifications du tissu cardiaque (analyse immunohistologique de la taille et de la composition de la zone lésée), la régénération des cellules contractiles du cœur (utilisation de marqueurs spécifiques sur des coupes de tissu cardiaque) et la fonction cardiaque (évaluée par échocardiographie). Ce projet se déroulera sur 4 ans et nécessitera au total 135 souris. Les différentes procédures expérimentales ont été consciencieusement pensées et définies afin d'utiliser le moins d'animaux possible tout en nous permettant d'obtenir des résultats statistiquement exploitables. De plus des paramètres expérimentaux tels que le nombre d'animaux ou bien encore les durées de traitements ont déjà été déterminés par d'autres projets nous permettant ainsi de

réduire le nombre d'animaux utilisés. Nous diminuerons au maximum la souffrance des animaux, toutes les procédures se feront sous anesthésie générale et des traitements antalgiques sont prévus. Nous avons établi une grille d'évaluation des points limites, si ces paramètres sont atteints, une mise à mort anticipée des animaux sera réalisée.

A terme, les résultats de ce projet permettront de mieux comprendre les mécanismes initiés par la réaction inflammatoire associée à l'infarctus du myocarde. Ces résultats pourraient conduire au développement de nouvelles approches thérapeutiques ciblant l'immunité adaptative chez les patients présentant des pathologies ischémiques cardiaques.

15778 L'adénomyose est une pathologie utérine chronique, oestrogénodépendante dont la physiopathologie demeure mal élucidée bien que l'immunité innée et acquise semblent jouer un rôle important. L'adénomyose se définit par la présence d'endomètre au sein du myomètre utérin entraînant une hypertrophie de ce dernier. Aujourd'hui les traitements disponibles sont principalement l'hystérectomie ou des traitements hormonaux empêchant la fertilité. L'hétérogénéité clinique de cette pathologie ainsi que sa prévalence élevée (elle touche environ 30% des femmes en âge de procréer) en font un centre d'intérêt pour de nombreux spécialistes. L'adénomyose est fréquemment associée à une autre maladie gynécologique inflammatoire, l'endométriose.

Les manifestations cliniques principales de l'adénomyose sont des ménométrorragies, des douleurs pelviennes ainsi qu'une diminution de la fertilité et une augmentation des fausses couches spontanées. La présence d'un infiltrat inflammatoire avec la présence de macrophages ainsi que de messagers solubles du système immunitaire au sein du tissu adénomyosique, mis en évidence dans différentes études confirme l'implication de l'immunité dans le développement de cette maladie.

Au cours de cette étude, nous souhaitons comprendre les mécanismes immunitaires (réponse cellulaire ou humorale) impliqués dans le développement de l'adénomyose grâce à un modèle murin.

Dans un premier temps, nous reproduirons le modèle murin d'adénomyose. Nous réaliserons une analyse histologique des cornes utérines. Ce modèle sera reproduit chez des souris immunodéficientes pour les lignées lymphocytaires T et/ou B, afin de préciser le type de réponse immunitaire impliquée dans le développement de l'adénomyose.

Dans un second temps, nous étudierons l'influence de l'endométriose sur le développement de l'adénomyose dans notre modèle murin et ses conséquences obstétricales. Pour cela, nous implanterons des fragments de cornes utérines à des souris atteintes d'adénomyose, afin de mimer l'endométriose.

Dans un troisième temps, des souris présentant de l'adénomyose, en association ou non à de l'endométriose, seront accouplées afin d'étudier par échographie l'influence de l'adénomyose sur la gestation. Les résorptions fœtales, l'adénomyose des cornes utérines et l'endométriose seront étudiées.

Un contrôle quotidien du bien-être et de l'état général des souris sera réalisé. De l'enrichissement sera placé dans chaque cage afin de ne pas perturber leur comportement. Au total nous utiliserons 525 animaux.

Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisé sera réduit à son minimum. De plus, afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, les procédures se dérouleront avec une surveillance journalière et des antalgiques sont prévus en pré et post opératoire. Pour minimiser les stress, les procédures d'imagerie et les prélèvements sanguins se feront sous anesthésie générale. Enfin, des points-limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

A terme, les résultats de ce projet permettront de comprendre plus précisément les mécanismes immunitaires impliqués dans le développement des lésions d'adénomyose afin de pouvoir développer de nouvelles stratégies thérapeutiques n'impactant pas la fertilité.

15779 Le cancer du foie est une maladie en pleine expansion avec actuellement plus de 8500 nouveaux cas par an en France et plus de 7000 morts par an. Il survient sur fond de maladie chronique du foie dans plus de 95% des cas. En dehors des causes classiques d'hépatites (virale C, virale B, alcoolique), la stéato-hépatite dysmétabolique prend de plus en plus d'importance (NASH). Cette maladie est due à l'association de plusieurs cofacteurs tels que l'obésité, le diabète, l'hypertension artérielle, la dyslipidémie et l'hypoxie intermittente résultant d'apnées du sommeil. Elle entraîne à terme une cirrhose et peut induire le cancer du foie avant même le stade de cirrhose dans plus de 50% des cas. A ce jour, le seul traitement systémique approuvé pour le CHC à stade avancé est le sorafenib, un inhibiteur de tyrosine kinase multi-ciblé présentant une modeste amélioration de la survie globale de 7,9 mois à 10,7 mois. De plus, ce traitement entraîne souvent des effets secondaires altérant la qualité de la vie du patient. Par conséquent, il existe un besoin urgent de thérapies nouvelles, efficaces et sûres. La fibrose et/ou la cirrhose modifient la vascularisation hépatique, la composition de la matrice extracellulaire et le métabolisme des médicaments. Par conséquent, il est essentiel d'utiliser un modèle d'animal avec CHC sur le fond de NASH et également dans le contexte de Fibrose / cirrhose afin d'étudier dans des tests précliniques futurs l'efficacité sur les tumeurs, mais aussi la tolérance du traitement.

Dans ce projet, la démarche éthique et l'application du principe des 3R sera envisagée comme suit :

Remplacer La carcinogenèse hépatique est un processus impliquant différents types cellulaires au sein du foie. Les lignées hépatocytaires tumorales humaines ne permettent pas de reproduire tout ce processus. L'utilisation de modèle animaux n'est donc pas pour l'instant remplaçable dans ce type d'études.

Raffinement A ce jour, la plupart des modèles animaux de NASH, sont des modèles de souris. Or la souris n'est pas capable de développer une cirrhose décompensée. Ce n'est donc pas un modèle animal qui reproduit la pathologie humaine. La fibrose et/ou la cirrhose modifient la vascularisation hépatique, la composition de la matrice extracellulaire et le métabolisme des médicaments. Par conséquent, il est essentiel d'utiliser un modèle animal avec CHC sur fond de NASH et également dans le contexte de Fibrose/Cirrhose qui nous permettra ensuite d'étudier, dans des tests précliniques futurs, l'efficacité des molécules thérapeutiques sur la régression des tumeurs et/ou la prévention du développement tumoral, mais aussi la tolérance du traitement. Dans notre laboratoire, nous travaillons depuis plusieurs années sur un modèle animal de rat permettant de mimer au mieux la pathologie humaine de développement tumoral hépatique sur fond cirrhotique (rats DEN). Dans le présent travail, nous nous proposons de faire évoluer ce modèle pour qu'il associe une NASH avec la cirrhose et le cancer. La NASH sera induite par un régime alimentaire riche en sucres et en lipides (western diet). Nous caractériserons en profondeur ces nouveaux modèles de rats afin de déterminer la prédominance du CHC, de la fibrose et de la NASH. Cette approche représente un raffinement essentiel des modèles *in vivo* de carcinogenèse hépatique. Le raffinement des 3R s'étend donc au-delà de ce projet avec un impact fort sur la méthodologie à venir et la transposition des résultats à l'homme. L'utilisation d'anesthésiant et/ou analgésique sera réalisée suivant les procédures afin de réduire au minimum la douleur, la souffrance et l'angoisse.

Réduction Ces mise au point de modèle permettra de nous préparer pour des études précliniques ultérieures avec le meilleur modèle et ainsi de réduire le nombre d'animaux utilisé dans les phases précliniques. De plus, un calcul des effectifs nécessaires basé sur une variable biologique simple (incidence de CHC) nous permettra d'atteindre une significativité des résultats avec un minimum d'animaux. Notre approche statistique est basée sur la comparaison de deux moyennes.

220 rats seront nécessaires pour cette version de l'étude.

Ce projet consiste en une procédure d'échographie réalisée sur des animaux inclus dans un protocole faisant déjà l'objet d'une autorisation. L'échographie est un examen d'imagerie qui recourt aux ultrasons pour visualiser l'intérieur d'un organe et l'ensemble des structures qui le composent sans avoir à euthanasier l'animal. L'échographie est indiquée dans le cadre du diagnostic et de la surveillance d'une atteinte hépatique (comme l'accumulation de graisse, stéatose) ou pour mettre en évidence la présence d'un corps anormal telle qu'une tumeur maligne ou non, ou de métastases. Le protocole permettant d'obtenir les meilleures performances nécessitent d'être réalisé par une

personne formée et compétente. La procédure utilisée chez le petit animal est la même que celle développée en clinique, mise à part qu'elle nécessite une épilation du rongeur, car les poils sont échogènes, et l'anesthésie volatile légère de l'animal afin qu'il soit immobilisé pendant 10-30 minutes suivant le nombre de mesures nécessaires.

Au total, 220 animaux seront inclus dans cette procédure. Le protocole d'imagerie échographique qui sera mis en œuvre n'entraînera pas de douleur, souffrance ou angoisse car il est réalisé sur animal anesthésié. Ce type d'imagerie permet de réaliser un suivi au cours du temps des mêmes animaux, réduisant par là même le nombre d'animaux nécessaire à une étude.

15780 Il est estimé que d'ici 2035, un quart de la population mondiale sera directement touchées par le cancer. Le défi de santé publique posé par le cancer devrait donc croître considérablement dans le monde au cours des prochaines décennies, à moins que nous n'élaborions et ne mettions en œuvre des stratégies plus efficaces de prévention, détection précoce et traitement du cancer. Il existe six principales modalités thérapeutiques pour le cancer la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie, la thérapie ciblée, l'immunothérapie et l'hormonothérapie. L'immunothérapie anticancéreuse représente conceptuellement une façon unique de traiter le cancer qui consiste à se concentrer sur l'élimination indirecte du cancer en exploitant la puissance du système immunitaire de l'hôte.

Il est maintenant établi qu'en tant qu'entité génétiquement modifiée, le cancer déclenche une réponse immunitaire de l'hôte au cours de son évolution. D'autre part, le microbiote intestinal et la paroi du tube digestif jouent un rôle essentiel sur le développement et la régulation du système immunitaire. En particulier, il a déjà été observé que des antigènes bactériens peuvent promouvoir une réponse immunitaire similairement à des cellules cancéreuses. En conséquence, la composition du microbiote intestinal peut influencer sur l'efficacité de l'immunothérapie en agissant comme un facteur immunostimulateur.

Sur la base de ces connaissances, ce projet consistera à réaliser une preuve de concept en utilisant l'ovalbumine comme antigène. L'objectif sera d'évaluer l'impact de la vaccination sur la réponse immunitaire chez des souris sensibilisées à l'ovalbumine. Afin de contrôler les antigènes bactériens intrinsèques au microbiote des souris, un modèle constitué d'un microbiote simplifié et contrôlé sera utilisé. Des souches bactériennes modifiées présentant l'ovalbumine seront administrées par gavage oral à des souris qui seront accouplées afin de produire une génération de souris nées avec un microbiote présentant l'ovalbumine. L'effet de l'immunisation sera comparé entre des souris colonisées avec un microbiote exprimant soit l'ovalbumine, soit un adjuvant témoin négatif.

Si cette preuve de concept avec l'ovalbumine réussit, cela permettra ensuite d'explorer de nouvelles thérapies contre le cancer en sensibilisant le système immunitaire contre des antigènes bactériens mimiquant des antigènes exprimés par les cellules tumorales.

Le projet a été conçu pour respecter la règle des 3R : raffiner, réduire, remplacer. En effet, l'utilisation de souris avec un microbiote contrôlé permet de réduire la variabilité inter-individuelle et donc le nombre d'animaux sans toutefois mettre en péril une interprétation statistique des résultats. D'autre part, la validation en amont des outils d'analyse immunologique et la pré-sélection des souches bactériennes modifiées sur un nombre restreint de souris, permet de réduire au maximum le nombre total d'animaux et de groupes du projet. Cette étude implique une réponse intégrée au niveau de l'organisme (interactions système immunitaire - microbiote), ce qui justifie une étude chez l'animal. Les procédures expérimentales n'engendreront pas de souffrance ou de stress spécifique car il s'agit d'administration orale d'une bactérie commensale non pathogène, d'une vaccination sous-cutanée répétée à distance de deux semaines et de prélèvements de sang réalisés sous anesthésie. Les conditions d'hébergement, les soins et les procédures seront réalisés par du personnel qualifié et les souris seront suivies individuellement tous les jours pendant toute la durée du projet.

Il s'agit d'une étude sur 247 souris portant sur 5 ans, en raison de la durée du protocole et du nombre de groupes considérés.

15781 La signalisation purinergique permet la communication entre les cellules de l'organisme. Dans le système nerveux, l'ATP libéré par les neurones et les cellules gliales va se fixer sur ses récepteurs appelés P2X et moduler la transmission nerveuse et la communication neurone-glie. L'activation de cette signalisation est impliquée dans de nombreuses pathologies nerveuses. Afin de déterminer le rôle des récepteurs P2X dans les maladies neurologiques, nos objectifs sont donc de mieux comprendre 1) les propriétés fonctionnelles des récepteurs P2X 2) le rôle des récepteurs P2X sur la fonction des autres neurotransmetteurs. Ces expériences seront menées *in vitro* en exprimant les récepteurs P2X et des récepteurs à d'autres neurotransmetteurs (GABA, Glutamate, sérotonine) dans des ovocytes de xénopes. Nous analyserons ensuite les propriétés fonctionnelles et pharmacologiques des récepteurs par différentes techniques. Cette méthode d'expression des récepteurs est utilisée en routine dans notre équipe et nécessite l'utilisation d'ovocytes prélevés sur des xénopes femelles. Les ovocytes ont deux avantages majeurs par rapport aux lignées cellulaires permanentes 1) Ils ont la capacité d'exprimer simultanément toutes les protéines hétérologues que l'on souhaite étudier dans une même cellule et 2) ils sont dépourvus de récepteurs endogènes. L'expression hétérologue en ovocyte de xénopes permet de limiter les expériences sur des préparations natives de souris mais aussi d'analyser *in vitro* les propriétés des récepteurs humains. Afin de réduire le nombre de xénopes femelles utilisées, une seule préparation d'ovocytes sera effectuée au maximum 1 fois par semaine durant 10 mois/an afin de collecter lors d'une seule intervention l'ensemble des ovocytes nécessaires à toutes les expériences planifiées durant la semaine. Nous effectuons 3 à 4 prélèvements sur un même animal au cours de sa vie en effectuant une rotation complète de la totalité de nos animaux hébergés de façon à avoir une période de récupération entre deux interventions la plus longue possible afin de réduire au maximum l'inconfort des animaux. Afin de réduire le stress et la douleur des animaux pendant la procédure qui dure moins de 10 min, celle-ci s'effectue sous anesthésie (bain d'anesthésique qui pénètre par la peau) et au froid qui sert également d'anesthésiant et d'antalgiques. Aucun autre produit n'est administré car aucune étude n'a montré d'efficacité chez les amphibiens. Il est difficile de mesurer l'état de stress ou de douleurs chez les espèces d'amphibiens telles que les xénopes car ils ne présentent pas d'expression faciale et bouge très peu. Néanmoins, ils sont surveillés quotidiennement et en absence quasi complète de mobilité lors de stimulation (nourrissage, ouverture couvercle aquarium), engendra l'isolement de l'animal pour faciliter sa surveillance et récupération. Afin de réduire le stress des animaux au maximum durant leur stabulation, les xénopes sont hébergés au sein de l'animalerie aquatique et maintenus en groupe de 4 à 8 animaux dans des aquariums adaptés maintenue à 19 °C. L'ensemble des aquariums est alimenté en eau par une station d'alimentation et de traitement de l'eau qui assure la désinfection de l'eau, la filtration organique, biologique et contrôle les paramètres physico-chimiques de l'eau en permanence afin de garantir la stabilité du pH, conductivité et température. La lumière artificielle de l'animalerie effectue un cycle jour/nuit de 12h avec allumage et extinction progressive afin de mimer le lever et le coucher du soleil. L'environnement est enrichi par la présence de tunnel cylindrique dans lesquels les animaux peuvent se cacher afin d'améliorer leurs conditions de vie et de limiter leur stress. Nous utiliserons une douzaine d'animaux par an soit 60 au total sur 5 ans.

15782 Il arrive que les rats s'installent dans les maisons ou les bâtiments en général, or les rats peuvent faire de sérieux dégâts et peuvent être porteurs de maladies. Il existe plusieurs solutions pour s'en débarrasser, la plus violente étant l'utilisation de raticides. Le problème de ces produits est qu'ils ne sont pas toxiques que pour les rats, ils sont également toxiques pour les prédateurs des rats, les enfants, les animaux de compagnie et pour l'écosystème. Il existe également des pièges mécaniques létaux ou non. Il est également possible d'utiliser des odeurs pour les éloigner. Par exemple, l'huile essentielle de menthe poivrée fait fuir les rongeurs. Il semblerait que l'écorce de certains bois de la Réunion possède des effets répulsifs sur les rats, le but de cette étude est donc de vérifier ces allégations. Si cela s'avérait exact, cela signifierait que l'utilisation de ce bois permettrait d'avoir une méthode 100% naturel pour faire fuir les rats. Le seul moyen de vérifier cela est de tester ces bois directement sur des rats (aucun test *in vitro* ne peut répondre à la question). Des rats Wistar seront donc mis en présence de morceaux d'écorces de deux différentes essences de bois et leur comportement sera observé (attraction/répulsion/sans effet).

Respect de la règle des 3R

Remplacement il n'est pas possible de réaliser de tests *in vitro* en amont de cette étude

Réduction Le nombre d'animaux a été réduit au minimum nécessaire pour acquérir les informations souhaitées, c'est-à-dire 10 rats. En effet, il est possible que certains rats pas suffisamment actifs ne soient pas retenus pour l'étude.

Raffinement Les animaux seront simplement manipulés pour être transférés de leur cage à une boîte de test contenant une odeur. Cette étude ne va donc engendrer aucune souffrance pour les animaux. A la fin de l'étude les animaux seront conservés en vie.

15783 Les maladies cardiovasculaires (MCV) constituent l'un des désordres les plus courants en santé publique et représentent la première cause de décès dans le monde (30% des décès annuels). L'hypercholestérolémie est un facteur de risque associée au développement des MCV. Ainsi, il est important de contrôler la cholestérolémie afin de se protéger contre ces physiopathologies. Les approches thérapeutiques actuelles pour réduire les taux de cholestérol plasmatique chez l'Homme reposent sur l'inhibition de la biosynthèse du cholestérol et la réduction de l'absorption du cholestérol et des acides biliaires dans le tractus gastro-intestinal. Bien que ces approches paraissent attractives, elles présentent plusieurs limites essentiellement liées aux effets secondaires très graves (par ex, diabète) ainsi que la proportion importante de patients non répondeurs à ces traitements (20-30% des cas). Dans le cadre de ce projet, notre intérêt s'est porté particulièrement sur l'impact du microbiote intestinal sur la cholestérolémie. En effet, nous avons antérieurement démontré que le microbiote intestinal pourrait constituer une nouvelle stratégie pour le traitement de l'hypercholestérolémie. Certaines bactéries du microbiote intestinal ont déjà fait l'objet de recherches au sein de notre équipe. Ainsi, nous avons isolé 5 bactéries ayant des activités importantes impliquées dans la modulation du cholestérol. Le but de ce projet est de valider l'effet de ces bactéries sur l'augmentation de la cholestérolémie chez le modèle souris. Suite à cette expérience, de nouvelles stratégies thérapeutiques basées sur les bactéries du microbiote intestinal réduisant la cholestérolémie pourraient être adoptées pour traiter les MCV.

La souris, est l'espèce la plus couramment utilisée pour l'étude de la cholestérolémie en raison de sa petite taille et de la facilité de son hébergement et de sa manipulation. Elle reproduit un grand nombre des signes cliniques caractéristiques des pathologies que nous étudions.

Pendant 83 jours les bactéries ou du PBS seront administrées aux animaux par gavage oro-gastrique effectué par du personnel qualifié et entraîné à ce geste. Les souris recevront des régimes normaux et riche en cholestérol. Nous ferons 5 prises de sang espacées par 14 jours. Un suivi clinique sera effectué chaque semaine jusqu'à l'euthanasie de ces derniers. Une analyse approfondie de la réponse de l'hôte sera effectuée notamment la mesure de la cholestérolémie, des stérols fécaux et des sels biliaires (produits synthétisés à partir du cholestérol). La composition du microbiote intestinal, les paramètres inflammatoires ainsi que l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol seront également analysés après euthanasie.

Le protocole expérimental a été conçu afin de respecter au mieux la règle des 3R remplacer, réduire et raffiner.

Remplacer : Les mécanismes impliqués dans le métabolisme du cholestérol mettent en jeu des interactions complexes au sein de l'hôte, qui sont impossibles à reproduire dans un modèle cellulaire ou de culture d'organe. Ainsi, utiliser uniquement une approche *in vitro* pour ce projet exclurait les différentes interactions pouvant survenir chez l'hôte. De ce fait, le recours aux animaux est indispensable.

Réduire : Des tests préliminaires *in vitro* ont permis de sélectionner les 5 bactéries les plus actives sur la cholestérolémie. Le nombre minimum d'animaux nécessaire a été déterminé en se basant sur les données acquises lors des expériences préliminaires, des études précédentes publiées dans la littérature, mais aussi grâce à un test de puissance afin d'incorporer un nombre minimum d'animaux tout en gardant la possibilité d'obtenir des résultats statistiques significatifs. Pour cette étude, nous utiliserons 9 groupes de souris (n = 10). Le nombre total d'animaux nécessaires pour cette procédure est de 90 souris (n = 10 souris x 9 groupes).

Raffiner : Les souris seront hébergées par 5 dans des cages collectives. L'eau et la nourriture seront disponibles à volonté et les paramètres ambiants seront contrôlés régulièrement (température, humidité...). Un enrichissement de leur milieu sera mis en place afin de favoriser le bien-être des animaux et se matérialisera par l'ajout de papier absorbant à déchiqueter, de tiges métalliques pour grimper et de buchettes de bois à mordre.

Au cours de l'étude, les animaux seront examinés individuellement de façon quotidienne (à l'occasion de l'examen clinique et de la pesée) ce qui permettra de réagir le plus rapidement possible en cas de problème.

15784 La plasmaphérèse est une technique permettant de prélever du plasma de façon sélective. C'est une technique actuellement utilisée lors des séances classiques de don du sang chez l'humain. Mieux tolérée chez le donneur que le prélèvement de sang total, elle évite d'avoir à séparer les éléments du sang (globules rouges, plaquettes et plasma) après la collecte et permet au donneur de les conserver.

Grace à la réalisation de plasmaphérèses chez le porc, ce projet vise la constitution d'une « banque de sang », sous forme de plasma lyophilisé dont la conservation s'étend sur plusieurs mois. Elle permettra d'initier et de continuer des études sur le traitement du choc hémorragique et des troubles de la coagulation, pathologies mortelles courantes en traumatologie. De plus, cette préparation (plasmaphérèse, lyophilisation du plasma) étant identique à celle utilisée chez l'homme, elle permet de se rapprocher au mieux des conditions réelles rencontrées sur le terrain pour la réanimation des blessés.

Dans le respect des 3Rs

-Réduction L'étude se fera avec des animaux impliqués dans d'autres procédures au fur et à mesure de leur réception.

-Remplacer Le prélèvement de plasma ne peut être fait en *in vitro*.

-Raffiner Ce projet est réalisé sur le porc tranquilisé afin de lui éviter tout stress lors du prélèvement par une contention forcée et traumatisante pour l'animal. Ce prélèvement est fait avec une technique non invasive (prise de sang)

Ce projet implique 125 sujets sur 5 ans.

15785 La protéine HSF1 joue un rôle clé dans la protection contre le stress cellulaire via les protéines de choc thermique (Heat shock proteins, HSP). Des études *in vitro* ont également montré que les protéines de choc thermique joueraient un rôle dans la maturation des globules rouges et qu'il y aurait un lien avec le contrôle de l'inflammation. Notre projet vise à analyser le rôle *in vivo* de HSF1 dans la formation des globules rouges et les liens possibles entre production de globules rouges et l'inflammation. Nous avons choisi le poisson zèbre comme modèle d'étude.

Un des avantages importants du poisson zèbre est le fait qu'il permette de voir l'impact sur les cellules impliquées dans ces mécanismes par des méthodes non invasives comme l'imagerie. Dans un projet en cours nous avons généré des poissons invalidés pour le gène HSF1 (HSF1 KO) par la méthode CRISPR/Cas9. Avec cette méthode nous avons découpé une partie du gène HSF1 dans le génome du poisson zèbre. Ces poissons n'ont pas de phénotype dommageable. Pour permettre d'observer les cellules du sang dans ces animaux HSF1 KO nous allons croiser ces poissons avec des lignées de poissons transgéniques qui portent des marqueurs fluorescents pour les globules rouges, les cellules du système immunitaire, leurs précurseurs appelés cellules souches hématopoïétiques et des poissons qui ont des marqueurs pour la production de facteurs inflammatoires sécrétés. Ces poissons transgéniques ne devraient pas présenter de phénotype dommageable.

Les croisements suivants seront effectués, les poissons HSF1 KO seront croisés avec les poissons transgéniques qui possèdent

- des globules rouges fluorescents verts et rouges,

- des cellules souches hématopoïétiques fluorescentes verts,

- des phagocytes fluorescents verts et rouges,
- des vaisseaux sanguins fluorescents verts,
- des macrophages rouges et un marquage indirect pour un facteur inflammatoire qui apparaît en vert,
- des macrophages rouges et un marqueur pour un autre facteur inflammatoire qui apparaît en vert,
- des globules rouges et des vaisseaux sanguins verts.

Avec tous ces croisements nous allons générer 9 lignées la descendance de ces croisements sera croisée entre elle pour obtenir des poissons homozygotes pour l'inactivation de HSF1 et le gène marqueur fluorescent rouge ou vert. Les poissons ainsi obtenus ne devront pas avoir un phénotype plus dommageable que les poissons HSF1 KO seuls. Les poissons négatifs pour le gène invalidé et le gène marqueur fluorescents seront mis à mort. On gardera les poissons homozygotes de ces nouvelles lignées pour obtenir des oeufs, des embryons (<72 heures post fécondation) et larves (>72 heures post fécondation) avec lesquels nous allons faire les expériences suivantes : les embryons ou larves seront traités avec des produits qui pourraient jouer un rôle dans la formation de globules rouges, comme des facteurs inflammatoires ou l'érythropoïétine (EPO). Ils seront analysés par microscopie, on testera l'expression de gènes et on analysera les globules rouges et les autres cellules du sang.

Ces analyses se feront chez les embryons ou larves entre jour 2 et 5 après fécondation. Si rien n'est observé au jour 5, nous continueront au jour 7 ou jour 14. Environ 20 larves par point seront observées au microscope.

Les embryons, larves et poissons adultes (>90 jours post fécondation) seront mis à mort à la fin des expériences par surdose de benzocaïne. Les points terminaux pour les larves seront, en fonction des expériences, une production trop élevée en globules rouges ou des malformations. Les poissons qui sont négatifs pour les gènes d'intérêt après génotypage seront mis à mort à l'âge de 3 mois, après le génotypage.

Au maximum, 5220 larves /poissons adultes seront utilisées pour la totalité des expériences avec toutes les lignées.

Ce projet respecte les 3R

Réduction nous allons utiliser 9 couples par lignées pour obtenir le nombre nécessaire de poissons pour notre expérience. Nous allons faire un maximum pour restreindre les expériences aux embryons jusqu'à l'âge de 5 jours.

Raffinement les poissons sont élevés au nombre de 5 à 10 par litre d'eau au maximum, avec enrichissement de milieu (nauplies d'artémies). L'eau des embryons et larves est changé tous les jours. Dans tous les cas, nous anesthésions les animaux pour éviter toute souffrance.

Remplacement le poisson zèbre est un des meilleurs modèles pour les observations de cellules dans un animal vivant, au microscope et ces observations peuvent se faire plusieurs fois, ce qui n'est pas possible dans un autre modèle animal. Le poisson zèbre est déjà considéré comme animal de remplacement pour les mammifères et nous essayons

De faire un maximum d'expériences avec des embryons jusqu'au jour 5 après fécondation.

15786 Les lésions de la moelle épinière (LME) qui affectent 2.5 millions de patients dans le monde (dont 40 000 en France) induisent des symptômes allant de déficits sensitivo-moteurs légers à une tétraplégie complète, souvent associés à des douleurs neuropathiques. Les LME touchent majoritairement des personnes jeunes (moyenne d'âge à 33 ans), et représentent un enjeu majeur tant sur le plan de la santé individuelle que sur le plan économique et social. Il n'y a actuellement pas de traitement curatif efficace pour aucun des symptômes induits par une LME. Il est donc de grand intérêt de mettre en place des stratégies thérapeutiques visant à augmenter la récupération motrice et sensitive suivant une LME.

L'organisation neuro-anatomique, les mécanismes physio-pathologiques, les caractéristiques comportementales et donc la réponse à une LME diffèrent fortement entre les murins et les primates. Cette homologie avec l'Homme rend le primate non-humain plus approprié pour des

études pré-cliniques. C'est pourquoi, nous avons développé et caractérisé un modèle chirurgical de lésion médullaire partielle chez le *Microcebus murinus*, un petit lémurien plus prédictif quant à l'issue de stratégies thérapeutiques que les murins. De plus, sa petite taille (<100g) rend possible l'utilisation d'appareil d'imagerie par résonance magnétique (IRM) dédié aux petits animaux ce qui permet d'effectuer un suivi au cours du temps de l'évolution de la lésion médullaire chez le même animal.

Après une LME une cicatrice gliale se forme et constitue un obstacle physique et chimique majeur à la repousse des axones, donc à la récupération fonctionnelle. Cette cicatrice est majoritairement composée de microglie et d'astrocytes. Nous avons montré que l'inhibition temporaire de la prolifération de la microglie après une LME à l'aide d'un composé pharmacologique, induit une meilleure récupération motrice chez les souris nous allons donc étendre cette étude au primate non-humain. De plus, un dimorphisme sexuel dans la réponse inflammatoire induite par une lésion du système nerveux central ayant été reporté chez la souris et l'Homme, il semble indispensable de faire cette étude chez les mâles et les femelles. Cette étape est indispensable avant de pouvoir proposer à l'Agence Nationale de Sécurité du médicament et des produits de Santé (ANSM) un projet d'étude clinique.

Ce projet effectué chez un modèle de primate non-humain, déjà validé chez les murins, vise à modifier pharmacologiquement par voie orale, la mise en place de la cicatrice gliale qui se forme après une LME en modulant la prolifération de la microglie. Une section partielle de la moelle épinière sera réalisée au niveau thoracique bas (T9-T10), ce qui induira une paralysie temporaire du membre inférieur du côté lésé. La chirurgie sera réalisée sous anesthésie générale, les animaux seront suivis quotidiennement ce qui permettra d'adapter le traitement antalgique. La voie d'administration du composé pharmacologique sera orale (dans la nourriture) et la fréquence quotidienne sur une durée de 2 semaines. Les *Microcebus murinus* seront observés de façon longitudinale sur le plan comportemental et par IRM. Une analyse histopathologique sera effectuée en fin d'expérience.

Nous veillerons respect de la règle des 3R (réduction, remplacement et raffinement). Cette étude sera menée avec un nombre maximal de 18 lémuriens par sexe répartis en trois groupes (non traités et traités et avec 2 temps d'administration différents) de 6 animaux mâles et femelles âgés de 2-3 ans (effectifs requis pour l'exploitation statistique des résultats recueillis). Un total de 36 lémuriens sera donc utilisé. Les animaux seront hébergés en groupe dans des cages (2 m x 1 m x 1 m, 3 lemurs per cage), cependant les animaux devront être hébergés en cage individuelle pendant la période du traitement. L'observation quotidienne des signes cliniques relatif au bien-être des animaux sera réalisée afin d'éviter un inconfort prolongé. Les indicateurs privilégiés du suivi du bien-être seront (1) l'absence de variation anormale du poids corporel et l'état de forme générale (prostration, réactivité, agressivité, ...). Une attention particulière sera portée à l'enrichissement de l'environnement (perchoirs, renforcement positif, jouets). Un maximum d'attention sera porté à la maîtrise des techniques utilisées afin de limiter la douleur et le stress chez les animaux.

Ce projet a fait l'objet de trois demandes de financement évaluées et accordées en 2018 et 2019 par deux associations françaises de patients traumatisés médullaires ainsi que de deux financements d'une année recherche pour clinicien en 2018 et 2020.

15787 Les maladies cardiovasculaires (MCV) constituent l'un des désordres les plus courants de la santé publique et représentent la première cause de décès dans le monde (30% des décès annuels). L'hypercholestérolémie est un facteur de risque associée au développement des MCV. Ainsi, il est important de contrôler la cholestérolémie afin de se protéger contre ces physiopathologies. Les approches thérapeutiques actuelles pour réduire les taux de cholestérol plasmatique chez l'Homme reposent sur l'inhibition de la biosynthèse du cholestérol et la réduction de l'absorption du cholestérol et des acides biliaires dans le tractus gastro-intestinal. Bien que ces approches paraissent attractives, elles présentent plusieurs limites essentiellement liées aux effets secondaires très graves (par ex, diabète) ainsi que la proportion importante de patients non répondeurs à ces traitements (20-30% des cas). Dans le cadre de ce projet, notre intérêt s'est porté particulièrement sur l'impact du microbiote intestinal sur la cholestérolémie. En effet, nous avons

antérieurement démontré que le microbiote intestinal pourrait constituer une nouvelle stratégie pour le traitement de l'hypercholestérolémie. Certaines bactéries du microbiote intestinal ont déjà fait l'objet de recherches au sein de notre équipe. Ainsi, nous avons isolé 5 bactéries ayant des activités importantes impliquées dans la modulation du cholestérol. Sur la base des expériences réalisées sur le modèle souris nous avons identifié 2 bactéries ayant un fort potentiel anti-hypercholestérolémiant (réduction de la cholestérolémie). Le but de ce projet est de valider l'effet de ces 2 bactéries les plus efficaces en utilisant le modèle lapin, l'un des modèles les plus utilisés et les mieux documentés pour mimer l'hypercholestérolémie humaine.

Actuellement, le modèle lapin New zeland soumis à un régime alimentaire riche en cholestérol reproduit plusieurs caractéristiques physiopathologiques d'hypercholestérolémie et d'athérosclérose similaires à celles développées chez l'Homme ces lapins ont des taux élevés de cholestérol, ils développent également une athérosclérose (dépôt de cholestérol dans les artères) et un infarctus du myocarde (nécrose du muscle cardiaque), deux signes cliniques observés chez les patients mais rarement observés chez d'autres modèles animaux tels que les rongeurs.

Ceci explique l'utilisation du modèle lapin lors des études antérieures sur ces maladies et également lors de ce projet. Suite à nos expériences, de nouvelles stratégies thérapeutiques basées sur les bactéries du microbiote intestinal réduisant la cholestérolémie pourraient être adoptées pour traiter les MCV.

Les bactéries seront administrées aux animaux par gavage oro-gastrique. Un suivi clinique sera effectué chaque semaine jusqu'à l'euthanasie de ces derniers. Une analyse approfondie de la réponse de l'hôte sera effectuée notamment la mesure de la cholestérolémie, des stérols fécaux et des sels biliaires (produits synthétisés à partir du cholestérol). La composition du microbiote intestinal, les paramètres inflammatoires ainsi que l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol seront également analysés après euthanasie des animaux. Le nombre total d'animaux nécessaires pour cette procédure est de 70 lapins ($n = 10$ lapins \times 7 groupes). Pendant les 83 jours de l'expérience, nous ferons 6 prises de sang espacées par 14 jours.

Le protocole expérimental a été conçu afin de respecter au mieux la règle des 3R remplacer, réduire et raffiner.

Remplacer Les mécanismes impliqués dans le métabolisme du cholestérol mettent en jeu des interactions complexes au sein de l'hôte, qui sont impossible à reproduire dans un modèle cellulaire ou de culture d'organe. Ainsi, utiliser uniquement une approche *in vitro* pour ce projet exclurait les différentes interactions pouvant survenir chez l'hôte. De ce fait, le recours aux animaux est indispensable.

Réduire Des tests préliminaires *in vitro* ont permis de sélectionner les 5 bactéries les plus actives sur la cholestérolémie. Les 2 souches les plus fortement hypocholestérolémiantes ont été sélectionnées chez la souris. L'impact de ces 2 souches sur le développement de lésions d'athérosclérose chez le lapin est testé dans cette DAP. Le nombre minimum d'animaux nécessaires a été déterminé en se basant sur les données acquises lors d'expériences préliminaires, d'études précédentes publiées dans la littérature, mais aussi grâce à un test de puissance afin d'incorporer un nombre minimum d'animaux tout en gardant la possibilité d'obtenir des résultats statistiques significatifs. Pour cette étude, nous utiliserons 7 groupes de lapins, ($n = 10$). Le nombre total d'animaux nécessaires pour cette procédure est 70 lapins ($n = 10$ lapins \times 7 groupes).

Raffiner L'eau et la nourriture seront disponibles à volonté et les paramètres ambiants seront contrôlés en permanence (température, humidité...). Les lapins sont logés en cages individuelles, sans contrainte et selon les conditions en vigueur dans l'élevage. Néanmoins, les contacts sociaux obtenus par l'hébergement des différents animaux dans des cages adjacentes participent à l'enrichissement. Un enrichissement de leur milieu sera mis en place afin de favoriser le bien-être des animaux, par l'apport d'objets (balles, chaînettes, mezzanines, jouets en polypropylène) dans l'environnement et éventuellement un enrichissement alimentaire par apport de faibles quantités de foin stérilisé.

Au cours de l'étude, les animaux seront examinés individuellement de façon quotidienne (à l'occasion de l'examen clinique et de la pesée) ce qui permettra de réagir le plus rapidement possible en cas de problème.

15788 Détecter précocement les rechutes de l'insuffisance cardiaque est un enjeu de santé publique majeur. Nous proposons une approche originale qui consiste à implanter par voie endoscopique, dans la zone de la paroi gastrique la plus proche possible du cœur, un dispositif miniaturisé capable de recueillir des grandeurs physiques caractérisant l'activité du cœur, et de les transmettre à une station de recueil capable de les interpréter pour déclencher une réaction médicale appropriée si une chute d'insuffisance cardiaque est détectée.

Les paramètres à mesurer sont en particulier l'activité électrique, l'activité mécanique, et la saturation en HbO₂ de la paroi gastrique. L'activité électrique se mesure entre deux électrodes implantées dans l'estomac, qui peuvent être des clips gastriques. L'activité mécanique se mesure par un accéléromètre, qui peut être extrêmement miniaturisé. La saturation en HbO₂ se mesure par un dispositif optique simple et lui aussi facilement miniaturisable. La communication des informations à l'extérieur du patient peut se faire par divers protocoles, en particulier par le protocole « Blue Tooth Low Energy », capable d'être mis en œuvre dans un dispositif miniaturisé. Enfin, la batterie nécessaire au fonctionnement du dispositif peut également être très réduite, comme l'a montré l'expérience acquise en clinique sur les « leadless pacemakers ».

Par ailleurs, il a été démontré que l'insuffisance cardiaque s'accompagne d'une réponse du système nerveux autonome à une stimulation électrique transcutanée, qui se traduit par une variation du rythme cardiaque selon un pattern différent de celui observé en l'absence d'insuffisance cardiaque. Cette variation est particulièrement intéressante à étudier pendant le sommeil. Ce qui renforce l'intérêt pour un dispositif implanté permettant des mesures sur tout le nyctémère.

Nous travaillons donc à la conception d'un Dispositif d'Investigation Cardio-Respiratoire (DICR) miniaturisé, implantable dans l'estomac et capable de mesurer et de transmettre des paramètres caractéristiques de l'activité du cœur, en analysant des signaux électriques et mécaniques, y compris d'origine respiratoire. Un premier prototype analogique filaire nous a permis de démontrer notre capacité à détecter les signaux d'intérêt dans des conditions optimales d'acquisition (animal anesthésié). Suite à ces résultats préliminaires, un nouveau dispositif numérique a été développé, intégrant la possibilité de transmettre sans fil les paramètres recueillis, permettant ainsi l'acquisition de données sur plusieurs jours en conditions ambulatoires. Les résultats obtenus à partir de ce nouveau dispositif sont très prometteurs et confirment notre capacité à acquérir des signaux cardio-respiratoires sur l'animal vigile.

L'objectif principal de cette nouvelle étude est d'analyser les signaux acquis par notre dispositif sur un modèle animal d'insuffisance cardio-respiratoire afin de suivre le processus de décompensation. Cette étude permettra de mettre en évidence les paramètres cardio-respiratoires nécessaires à l'évaluation/prévision de la décompensation cardiaque avant la survenue de symptômes cliniques. Pour cette preuve de concept, les signaux acquis par le dispositif DICR implanté dans la zone sous-muqueuse de la paroi gastrique seront transmis par des conducteurs électriques fins jusqu'à un relai implanté permettant la communication (sans fil) jusqu'à une station située à proximité de l'animal.

Le dispositif DICR actuel étant à ce stade du projet trop volumineux pour être acheminé par un gastroscopie, nous choisissons d'accéder chirurgicalement à l'estomac pour fixer le dispositif à la paroi gastrique (le plus près possible du cœur).

L'étude sera réalisée sur des mini-porcs "Yucatan" comme modèle animal, en raison des nombreuses similitudes anatomo-physiologiques avec l'homme. Un modèle d'insuffisance cardiaque provoquée sera utilisée pour démontrer l'intérêt du DICR à des fins de diagnostic. Un maximum de 30 miniporcs seront utilisés dans le projet pour démontrer la pertinence et l'intérêt du DICR.

Il n'existe pas d'alternative à l'expérimentation animale pour développer et valider ce type de dispositif destiné à la mesure de paramètres physiologiques *in vivo*. Le remplacement n'est donc

pas possible. Les équipes impliquées dans le projet sont spécialistes des approches *in vivo* chez l'animal, ce qui assure des approches chirurgicales maîtrisées, ainsi qu'un soin et un hébergement des animaux dans des conditions optimales. Médecins, vétérinaires et animaliers associeront leurs expertises pour assurer la meilleure prise en charge des animaux. Le nombre d'animaux impliqués est limité au maximum, sans que cela puisse compromettre les conclusions du projet sur la faisabilité de l'approche.

15789 L'adénocarcinome du pancréas est un cancer en constante augmentation qui devrait d'ici fin 2020, il deviendra certainement le second cancer le plus mortel. Ce cancer est très difficilement pris en charge et son diagnostic souvent tardif ne laisse que peu d'opportunité de traitement thérapeutique, conduisant les patients à moins de 5% de chance de survie 5 ans après leur diagnostic. Plusieurs mutations impliquées dans cette pathologie ont déjà été identifiées chez l'homme. L'utilisation de modèles animaux dérivés de ces mutations a déjà permis de nombreuses avancées sur la compréhension de ces tumeurs. Malgré tout, l'identification de nouvelles mutations candidates souligne le besoin constant de développer de nouveaux modèles afin de comprendre la complexité de cette maladie. Afin de maintenir notre recherche et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques, nous sommes contraints de maintenir en élevage plusieurs lignées de souris génétiquement modifiées qui modélisent les différentes étapes conduisant au développement des cancers pancréatiques. La collecte d'échantillons biologiques post-mortem, la préparation de cellules tumorales pour réaliser des travaux *in vitro* ainsi que la préparation de cohortes expérimentales pour des collaborateurs souhaitant tester des traitements thérapeutiques montrent l'intérêt de maintenir ces modèles.

Notre demande vise donc à assurer le maintien en élevage de 5 modèles différents pour lesquels les animaux parents ne présentent pas de pathologie mais dont la combinaison peut conduire à la naissance d'animaux prônant à développer rapidement des atteintes cancéreuses du pancréas après leur entrée à l'âge adulte. Afin de nous conformer à la règle des 3Rs (Remplacement, Réduction et Raffinement), le nombre de souris nécessaire à la maintenance de nos 5 modèles sera réduit au maximum pour limiter la génération d'animaux non nécessaires sans compromettre leur maintien. Si besoin, les lignées non utilisées seront cryopréservées. En raison de la nature complexe de ces recherches, nous ne pouvons malheureusement pas remplacer l'utilisation de modèles murins par des outils cellulaires ou des approches *in vitro*. Nous mettrons en place une surveillance adaptée et individuelle des animaux afin d'assurer que les animaux d'élevage ne subissent aucune souffrance. Ce suivi individuel permettra d'identifier l'apparition de signes évocateurs de mal-être ou de souffrance des animaux étudiés (prostration, perte de poids) qui entraînerait alors une fin d'expérimentation immédiate. Dans leur ensemble, ces approches devraient réduire le nombre d'animaux utilisés et éviter toute souffrance inutile.

La maintenance des 5 lignées expérimentales concernées, nécessitera l'utilisation d'un maximum de 300 souris sur une période de 5 ans afin d'assurer le maintien et la production de cohortes expérimentales soumises à d'autres demandes éthiques.

15790 Les maladies de gencive sont des pathologies inflammatoires d'origine infectieuse très répandues dans la population mondiale. Elles se caractérisent par une infection et une inflammation des tissus de soutien des dents (gencive, os) aboutissant au déchaussement et à la perte des dents. A l'heure actuelle, les traitements visent à contrôler le facteur infectieux (les bactéries de la plaque dentaire) via une décontamination mécanique et chimique des surfaces des racines dentaires. Bien que ces traitements soient efficaces dans un grand nombre de cas, le traitement des formes sévères est moins prédictible et le développement de stratégies de traitement permettant la régénération des tissus détruits apparaît nécessaire. Dans ce contexte, le développement de médicaments anti-infectieux, anti-inflammatoires ou faisant appel à des facteurs de croissance sont actuellement en cours de développement.

L'objectif de ce projet est d'évaluer les propriétés de certaines molécules pharmacologiques (anti-inflammatoires, anti-infectieuses, pro-régénératives) sur l'optimisation du traitement des gencives seules ou en association avec des biomatériaux reproduisant la structure des tissus d'origine.

L'ensemble de ce projet utilisera au maximum 1656 souris sur la période de 5 ans.

Remplacement Cette approche *in vivo* permettra de confirmer les résultats obtenus par l'approche *in vitro* démontrant leur biocompatibilité et validant leurs propriétés anti-inflammatoires, anti-infectieuses et pro-régénératives, car il n'est pas possible de reproduire de manière fidèle la complexité des interactions tissulaires et cellulaires des tissus entourant les dents *in vitro*. Des modèles expérimentaux permettant de prendre en compte cette spécificité et complexité seront utilisés (parodontite expérimentale, défaut osseux au niveau de la voûte crânienne).

Réduction Le nombre d'animaux sera réduit par l'emploi de méthodes statistiques adaptées. Les molécules pharmacologiques et les substituts tissulaires seront d'abord testés *in vitro* pour sélectionner les plus prometteurs.

Raffinement Le raffinement se fait par une prise en compte du bien-être animal (enrichissement du milieu et soins quotidiens aux animaux), par l'établissement de points limites permettant de limiter la douleur et la souffrance de l'animal, et par l'utilisation d'anesthésiques, d'antalgiques et de soins péri- et post-opératoires adaptés.

15791 Les cultures de cellules sont des modèles d'études très utiles pour étudier et caractériser les fonctions d'un organe. Cependant, les modèles classiquement utilisés sont des mono-cultures (un seul type cellulaire), cultivées en 2 dimensions (2D), conditions expérimentales relativement éloignées des conditions physiologiques dans lesquelles les cellules évoluent au sein de l'organe. Des travaux récents ont montré que la culture en 3-dimensions (3D) permet de mimer davantage le fonctionnement de l'organe d'origine. Ces nouveaux modèles de cultures 3D offrent donc de nouveaux outils pour la recherche fondamentale comme appliquée ou encore la thérapie tissulaire.

A partir de cellules de tissus adipeux humains, nous avons mis au point des cultures 3D. Ces sphéroïdes miment un tissu adipeux particulier, capable de brûler des substrats tels que le sucre et les graisses et qui est aujourd'hui très étudié pour ses effets bénéfiques contre l'obésité et le diabète. Il est maintenant nécessaire d'évaluer la fonctionnalité de ces tissus adipeux humains reconstitués et leur capacité à améliorer le métabolisme de l'organisme. Ceci sera évalué grâce à des expériences de greffe chez des souris immuno-déficientes (pour éviter le rejet des cellules humaines greffées). Pour réaliser ce projet, nous envisageons de travailler sur deux souches de souris immuno-déficientes. Une même souris sera évaluée pour plusieurs paramètres métaboliques, mesurés au cours d'expériences successives et espacées de plusieurs jours. Ainsi le nombre de souris est réduit à son minimum nécessaire sans compromettre les objectifs du projet et permettant un traitement statistique optimal des données récoltées.

Nous avons évalué à 420 le nombre de souris utilisées dans ce projet, réparties en 28 lots de 15 animaux chacun.

L'ensemble des fondements de la règle des 3R est appliqué dans ce projet

- Les conditions d'expérimentation font l'objet d'un travail de raffinement continu dans le but d'aboutir à des procédures de travail définies avec une procédure de suivi du bien-être animal adaptées aux expériences. En effet, les animaux ne seront jamais seuls en cage et nous proposons aussi d'enrichir l'environnement des souris, favorisant le bien-être de l'animal.

- Chaque étude est discutée avec l'ensemble de l'équipe de recherche afin de garantir la pertinence de chaque expérience et d'établir un protocole d'étude adapté à l'obtention de résultats fiables permettant d'atteindre l'objectif. La planification des expériences est organisée de manière à optimiser au maximum les études afin de réduire le nombre d'animaux en évitant la répétition des groupes contrôles indispensable à la validation des résultats mais aussi en multipliant les tests faits à partir des tissus prélevés chez les animaux.

- Il est à noter que ces modèles de cultures en 3D nous ont déjà permis de remplacer le modèle animal pour étudier les mécanismes essentiels à leur développement. Les meilleures conditions seront validées *in vitro* au préalable avant leur transplantation.

15792 Les maladies pulmonaires sont généralement associées à une inflammation des voies respiratoires. Parmi les plus graves on trouve la fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) et la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO). La FPI est caractérisée par une détérioration progressive des tissus conduisant à une inflammation généralisée et à la formation de cicatrices pulmonaires. Cette pathologie entraîne une insuffisance respiratoire à l'issue fatale. Elle affecte environ 5 millions de personnes dans le monde, et son taux moyen de survie est de 3 à 5 ans avec un âge moyen de début de 66 ans (75% ont plus de 65 ans). De nombreux facteurs de risque sont décrits, à commencer par la fumée de cigarette, les maladies de reflux gastro-œsophagien, ou certains agents infectieux. Si les risques sont identifiés, les causes sont encore inconnues. Le diagnostic de la fibrose est souvent difficile. Il nécessite la corrélation de plusieurs observations issues des examens physiques et de l'historique physiopathologique précis du patient, parfois associés à une biopsie pulmonaire ou à un lavage broncho-alvéolaire. Aucun traitement n'est actuellement disponible pour la FPI. Seuls certains médicaments sont utilisés pour freiner l'avancée de la maladie, mais ils ne sont que de faible efficacité. L'ultime recours est la greffe pulmonaire mais ne permet, en cas de succès, qu'un léger rallongement de l'espérance de vie.

La BPCO est caractérisée par une inflammation pulmonaire provoquant des lésions tissulaires et un rétrécissement des voies aériennes rendant la respiration difficile. Actuellement 64 millions de personnes ont une BPCO, et 3 millions de personnes en sont mortes. L'OMS prévoit que la BPCO deviendra la troisième cause de décès dans le monde en 2030. Le tabagisme est le principal facteur de risque, on estime que 40 à 50% des personnes ayant fumé toute leur vie développeront une BPCO. Comme pour la FPI, il n'existe aucun traitement curatif de la BPCO. La prise en charge de cette pathologie comprend la réduction des facteurs de risque, notamment la tabagisme et l'utilisation de bronchodilatateurs pour aider à prévenir les exacerbations.

Ces pathologies étant incurables, il est donc nécessaire de pouvoir évaluer, sur des modèles physiologiques intégrés, l'impact de nouveaux candidats pharmacologiques ou cellulaires pour mieux traiter ces pathologies. La complexité de ces maladies, dont la composante est à la fois multicellulaire et humorale, nécessite de pouvoir faire la preuve de concept et d'efficacité dans un organisme intégré comme l'animal. L'objectif de ce projet est de re-créeer les pathologies observées chez l'Homme en utilisant 3 modèles différents chez la souris. La fibrose pulmonaire sera induite par inhalation de bléomycine, un antibiotique entraînant une toxicité pulmonaire. Dans un deuxième protocole, les animaux inhaleront de la fumée de cigarette afin déclencher de une BPCO. Le troisième protocole consistera à induire un emphysème pulmonaire par inhalation d'élastase. Les molécules à tester ou les cellules souches mésenchymateuse utilisées en thérapies cellulaires seront administrées en curatif ou préventif. Ce projet prévoit 90 souris par an soit 450 animaux sur la totalité du projet.

Dans le respect de la règle des 3R, et lorsque cela est possible ces candidats sont évalués sur culture cellulaire ou organe isolé préalablement aux tests animaux afin de remplacer ou de réduire le nombre d'animaux impliqués dans les protocoles. Nous utiliserons le nombre minimum de souris nécessaire à une analyse statistique en prenant en compte la variabilité inter-individuelle. D'autre part, un raffinement des protocoles sera effectué en fonction des avancées technologiques dans le domaine. Les souris sont hébergées selon les conditions de la nouvelle réglementation 2010/63 en unités individuelles ventilées de type III ou IV avec enrichissement de l'environnement (composants de nidification et igloo). Chaque animal entrant dans une étude disposera d'une fiche individuelle de suivi sur laquelle tout traitement et observation seront reportés. L'état de santé des animaux sera évalué quotidiennement selon des critères définis par l'AFSTAL, d'apparence physique (perte de poids significative, gêne respiratoire) et comportementaux (souris prostrée, agressivité) définis en accord avec le comité de suivi du bien-être animal de notre établissement. Une dégradation trop importante de l'état de santé (au delà d'un score de 8 selon les critères détaillés dans les procédures expérimentales) pourra entraîner l'arrêt immédiat de l'expérimentation. Certains critères suffiront à eux seuls à l'arrêt de l'expérience, telle qu'une perte de poids trop importante ou la suffocation de l'animal.

15793 Le rein est principalement formé de petits tuyaux repliés de façon complexe. Ces tubules sont constitués de cellules se renouvelant lentement chez l'adulte sain et à la fin du développement rénal il n'est pas possible d'en fabriquer de nouveaux.

La grande majorité des pathologies rénales sont associées non seulement à une augmentation de la mort des cellules tubulaires mais aussi à une augmentation de leur division. L'effet de cette augmentation conjointe de la prolifération et de la mort cellulaire est difficile à évaluer, on pense cependant que ce paramètre joue un rôle décisif dans de nombreux aspects des maladies rénales chroniques.

Les mécanismes responsables de ces pathologies complexes et graves ne peuvent pas être étudiés *in vitro* et les modèles animaux jouent un rôle central dans la mise au point de nouveaux traitements.

L'objectif de cette étude est d'utiliser une nouvelle technique expérimentale de microscopie permettant de mesurer en 3 dimensions la structure et le contenu cellulaire des tubules rénaux chez la souris afin de mesurer, pour la première fois, l'évolution de la population des cellules tubulaires dans le rein sain ainsi que dans plusieurs situations pathologies caractérisées par une augmentation de la prolifération et de la mort des cellules tubulaires (fibrose, croissance compensation et polykystose rénale).

Cette technique sera utilisée pour mesurer le rythme de renouvellement des cellules tubulaires chez l'adulte ainsi que les modifications de l'architecture cellulaire des tubules induites par la compensation d'une perte de la masse rénale. Pour cela nous utiliserons une lignée de souris génétiquement modifiée permettant de marquer une petite fraction des cellules tubulaires par l'administration d'une dose unique d'un médicament suivie d'une néphrectomie d'un seul ou des deux reins. Les interventions chirurgicales seront réalisées sous anesthésie générale pour éviter toute souffrance aux animaux.

Deux autres modèles murins seront étudiés la fibrose rénale par ligature de l'uretère et la polykystose rénale induite par l'administration d'un médicament dans l'eau de boisson.

Ces expériences utiliseront un maximum de 216 souris sur 3 ans.

Afin de réduire le plus possible le nombre d'animaux, toutes les mises au point ont été effectuées sur des tissus prélevés sur des animaux post-mortem. De plus, une meilleure connaissance de l'architecture rénale permettra de réduire le nombre d'animaux nécessaires pour des conclusions robustes.

Des points limites ont été définis entraînant si nécessaire la mise à mort anticipée des animaux. Toutes les procédures douloureuses sont effectuées sous anesthésie générale associée à une analgésie postopératoire.

Les résultats obtenus permettront de mieux comprendre les mécanismes de compensation et de détérioration du rein et devraient contribuer à la mise au point de nouvelles stratégies thérapeutiques pour ces affections.

15794 CONTEXTE : L'adénocarcinome pancréatique fait partie des cancers les plus agressifs. Quel que soit le traitement, le taux de survie global à 5 ans est inférieur à 5%. Cette maladie est souvent diagnostiquée à un stade avancé et, par conséquent, seulement 15% à 20% des patients sont candidats à une résection chirurgicale. Environ 30% à 40% des patients ont une maladie métastatique au moment du diagnostic et dans ces cas, la survie est d'environ 9 mois. Les 30% à 40% restants des patients ont un cancer pancréatique localement avancé au moment du diagnostic, leur survie globale médiane est d'environ 1 an. Bien que de nouveaux protocoles de chimiothérapie entraînent une survie améliorée, le pronostic pour le cancer pancréatique localement avancé reste sombre et sans perspective de survie à long terme.

Il a été démontré dans un premier temps qu'il était possible de détruire du tissu pancréatique par un traitement par ultrasons focalisés à haute intensité (HIFU). Il a alors été observé que les HIFU appliqués au niveau de l'isthme du pancréas pouvaient entraîner l'obstruction de l'artère hépatique, ce qui n'est pas compatible avec une utilisation clinique de la technique en l'état. En effet, une occlusion artérielle serait en clinique une complication majeure non acceptable. Pour comprendre

et contrôler ce phénomène, une nouvelle approche par imagerie Doppler a été envisagée. Une seconde phase a permis la validation d'un logiciel d'évaluation de l'évolution du flux artériel issu de l'information Doppler acquise au cours d'un traitement HIFU. Le seuil de traitement à ne pas dépasser pour éviter l'occlusion du vaisseau ayant été fixé empiriquement sur la base des données des précédentes procédures, il est important de le tester et de le relier à la création d'une sténose. L'innocuité du traitement et de la procédure a été également montré précédemment.

OBJECTIFS : Le but est d'évaluer la pertinence de l'outil développé, c'est-à-dire observer qu'il n'y a pas d'occlusion de vaisseau en ne dépassant pas le seuil fixé et en observant une occlusion en le dépassant. Il sera également évalué qu'il n'y a pas d'effet cumulatif, qu'un traitement peut être réitéré sans engendrer de problème.

TYPE DE PROJET/PROCEDURES/ESPECE ANIMALE/SORT DE L'ANIMAL

Ce projet de recherche translationnelle d'une durée maximale de 2 ans mettra en œuvre 12 porcs distribués en 3 groupes. Le modèle expérimental est représenté par l'artère hépatique commune de l'animal qui présente l'intérêt d'avoir une taille (5 mm de diamètre) sensiblement identique à l'artère mésentérique humaine qui sera incluse dans les protocoles de traitement clinique des tumeurs pancréatiques. Ce projet constitue une étape importante avant l'utilisation de la technique en clinique.

Au cours d'une procédure jugée modérée, les animaux subiront une laparotomie sous anesthésie générale, le traitement HIFU puis seront réveillés et maintenus sous observation pendant 15 jours, temps permettant d'évaluer les éventuels dommages de l'artère et seront ensuite mis à mort et autopsiés.

CONFORMITE AVEC LES 3R

Réduction 4 animaux par groupe correspondent au nombre minimal pour montrer la fiabilité du logiciel d'évaluation du flux artériel.

Raffinement Le protocole d'anesthésie a été mis au point afin d'éviter toute souffrance. La chirurgie est effectuée par un chirurgien expérimenté. Un protocole antidouleur pendant et après la chirurgie sera mis en place avec un suivi très serré. Le suivi est facilité par un scoring qui reflète l'état de l'animal et qui permet facilement de prendre la décision d'arrêt de la procédure pour l'animal.

Remplacement Les mises au point des techniques HIFU et Doppler ont été au préalable évaluées *in silico* et testées *ex vivo* ce qui a permis de repousser le passage à l'animal. Les organes non prélevés dans ce projet seront proposés à d'autres chercheurs pour la réalisation de test *ex vivo*.

15795 Le foie a un rôle primordial dans la régulation du métabolisme général il participe de façon majeure au maintien de l'équilibre entre les apports (via l'alimentation) et les dépenses énergétiques, afin de maintenir le poids corporel autour d'une constante. Le foie est également l'organe prépondérant pour l'élimination des contaminants de l'alimentation et des polluants environnementaux ces derniers, après ingestion, circulent jusqu'au foie, où ils sont dégradés par des enzymes hépatiques puis éliminés dans l'urine et les fèces.

Les différentes fonctions du foie sont principalement régulées au niveau de la transcription des gènes par des récepteurs nucléaires qui sont de senseurs des contaminants (CAR, PXR) et des nutriments (PPARs). Par l'intermédiaire de ces récepteurs nucléaires, des composants ou contaminants alimentaires peuvent perturber le fonctionnement normal du foie en modifiant le niveau d'expression des gènes clés de voies métaboliques essentielles (récepteur à l'insuline, P110alpha, Fgf21, Myd88,). Afin d'étudier les effets des polluants sur la physiologie du foie, nous faisons habituellement appel à des études *in vivo* réalisées sur modèle murin spécifique chacune de nos lignées murines a été invalidée par ingénierie génétique pour un des gènes cités ci-dessus. En réalisant des études *in vivo* sur des souris invalidées ou non pour un de ces gènes et exposées ou pas à une molécule, il est possible d'étudier l'impact du composant ou du contaminant alimentaire sur la voie métabolique contrôlée par ce gène.

Il est désormais nécessaire d'approfondir les connaissances sur les mécanismes moléculaires impliqués dans la perturbation du fonctionnement du foie exposé à des contaminants. Nous

souhaitons en particulier comparer l'effet des contaminants délivrés à diverses doses, y compris les faibles doses, et l'effet des contaminants délivrés seuls ou en mélange avec d'autres contaminants (cocktails). Ce contexte nécessite un grand nombre de groupes traités et d'individus, aussi les études *in vivo* ne seraient pas le modèle idéal.

Notre projet est donc de réaliser ces études sur des hépatocytes extraits de foies de souris et aussitôt mis en culture primaire dans un milieu physiologique adapté.

Pour chaque mise en culture primaire d'hépatocytes, les souris seront anesthésiées puis le foie sera perfusé pendant 5 minutes avec du tampon renfermant de la collagénase avant d'être collecté. Ce geste conduira à la mort instantanée de l'animal. Les hépatocytes seront isolés à partir des foies extraits et mis en culture primaire, avant d'être exposés aux contaminants étudiés.

La souris est un modèle de choix car adapté aux mécanismes que nous étudions, et qui permet d'invalider une protéine d'intérêt dans un organe en particulier.

La mise en culture primaire d'hépatocytes est une méthode alternative qui met en pratique les 3R

- remplacement Les études expérimentales ne sont pas réalisées *in vivo* sur animaux, mais sur cellules mises en culture primaire.

- réduction L'utilisation d'animaux reste nécessaire pour obtenir des hépatocytes. Néanmoins, nous ne ferons nos études que sur des hépatocytes extraits de foies de souris mâles, afin de limiter le nombre d'animaux. Par ailleurs, la technique que nous utiliserons a été optimisée pour obtenir un maximum de cellules (60 millions) à partir de 5 souris seulement par jour de mise en culture primaire. Cette grande quantité d'hépatocytes permettra de constituer un grand nombre d'échantillons permettant de tester plusieurs doses ou mélanges de molécules par session.

Au vu du nombre d'études à mener, 646 animaux seront utilisés sur 5 ans. Basé sur les données de la littérature et des études antérieures du laboratoire, ce nombre d'animaux est le nombre minimum nécessaire mais suffisant afin d'obtenir des résultats exploitables.

- raffinement Les animaux sources des hépatocytes ne subissent aucun traitement avant le jour de récupération des hépatocytes. Nous veillerons au bien-être des animaux destinés à la récupération des hépatocytes, en leur assurant les meilleures conditions d'hébergement (hébergement collectif) depuis leur naissance jusqu'au jour de leur mise à mort, dans un environnement contrôlé, une surveillance quotidienne par le personnel soignant et des enrichissements du milieu de vie (cabanes inox et ouate dans les cages). Si un animal présente un signe quelconque de souffrance pendant son élevage, il sera aussitôt euthanasié et ne sera pas conservé pour l'étude pour laquelle il était programmé. La dose du mélange anesthésiant a été calculée pour maintenir une anesthésie profonde et une analgésie depuis le moment de l'endormissement jusqu'à la mort de l'animal (temps total 15 minutes).

15796 Ce projet vise à mieux comprendre le fonctionnement des vaccins vivants atténués contre les salmonelloses. Les infections par les bactéries *Salmonella* restent un problème important pour la santé humaine et vétérinaire. Elles consistent en des infections de type typhoïde et des infections invasives de type non-typhoïde. Ces infections affectent plus de 20 millions d'individus et causent environ un million de morts par an dans le monde. Il existe deux vaccins contre les *Salmonella* de type typhoïde, dont un vaccin vivant atténué. Ces vaccins n'ont une efficacité que de 50 à 80% et l'immunité conférée est limitée dans le temps. Il n'y a pas de vaccin disponible contre les *Salmonella* de type non-typhoïde, alors que ces infections deviennent de plus en plus fréquentes dans certaines parties du monde.

Les cellules du système immunitaire protégeant contre ces infections après vaccination sont les lymphocytes T CD4 mémoires, les cellules B mémoires, et les plasmocytes (cellules productrices d'anticorps) mémoires. La génération et les propriétés de ces cellules mémoires induites après vaccination par une *Salmonella* atténuée sont peu connues. Notre projet vise à mieux comprendre les signaux impliqués dans la génération de ces cellules. En particulier, ce projet a pour but 1) d'identifier le répertoire des récepteurs à l'antigène exprimés par les cellules T CD4 et B mémoires 2) de tester si cette infection induit la génération plasmocytes mémoires à longue durée de vie 3) de définir les propriétés moléculaires des plasmocytes générés par cette vaccination. Les réponses

immunitaires générant ces cellules ont lieu dans les organes lymphoïdes secondaires, et impliquent des interactions cellulaires complexes qui ne sont pas modélisables *in vitro*. En outre, il n'existe pas de système de culture cellulaire *in vitro* permettant de produire des cellules T et B mémoires, et des plasmocytes mémoires.

Ce travail sera effectué en utilisant des protocoles expérimentaux optimisés dans notre laboratoire alors situé en Allemagne durant les 15 dernières années. Nous utiliserons un modèle très bien établi de vaccination des souris par voie intraveineuse avec une souche de Salmonella atténuée non-typhoïde de type Typhimurium. Cette souche vaccinale n'est pas létale pour la souris, et induit un état de résistance contre une infection par une Salmonella Typhimurium non atténuée. L'utilisation de cette souche vaccinale réduit la souffrance des souris. Nous utilisons des doses de Salmonella réduites qui ne causent pas de réponse inflammatoire élevée et donc ne résultent pas en l'apparition de symptômes cliniques témoignant d'un inconfort des souris. Cette vaccination induit la génération de cellules T CD4 et B mémoires, ainsi que des plasmocytes, et est donc pertinente pour les questions posées. De nombreuses expériences préliminaires garantissent la validité de notre démarche expérimentale. Nous avons dimensionné cette étude pour utiliser le nombre strictement minimal de souris nécessaires. Cette étude est prévue sur 5 ans et nécessitera au total 172 souris. Les connaissances acquises par ce projet préciseront comment la mémoire immunitaire se met en place après immunisation par des vaccins bactériens atténués, et permettront d'envisager de nouvelles stratégies vaccinales plus efficaces contre les infections bactériennes.

15797 Les infections récurrentes dans les élevages ont des effets majeurs sur la santé et le bien-être des animaux, ainsi que sur la qualité nutritionnelle et microbiologique des produits alimentaires d'origine animale.

Notre laboratoire s'intéresse aux facteurs influençant l'immunité mammaire dans le contexte des élevages bovins et ovins dans l'objectif de réduire le recours à des traitements pharmaceutiques.

D'une part, un premier projet s'intéresse au rôle d'une protéine régulatrice de la réponse immunitaire. Son rôle dans la croissance a été bien étudié mais son rôle dans l'immunité est beaucoup moins connu. Une mutation ponctuelle de cette protéine, qui invalide sa fonction, a été identifiée comme prédisposant les animaux aux infections. Nous avons donc développé un modèle de souris portant cette mutation ponctuelle pour étudier plus finement ses conséquences fonctionnelles et biologiques.

D'autre part, un second projet porte sur l'étude du potentiel immunostimulant de l'administration d'alicaments, les Béta-Glucanes, qui sont des composants naturels des parois fongiques. Les Béta-glucanes ont la capacité d'augmenter la réponse des cellules immunitaires vis à vis des bactéries. Des souris invalidées pour le récepteur de ces molécules (Dectin-1), présent sur certaines cellules immunitaires, sont utilisées pour mieux comprendre les mécanismes impliqués dans cette immuno-stimulation.

La compréhension des mécanismes qui modulent la réponse immunitaire, en lien avec le fond génétique ou à la suite de la consommation d'alicaments, permettra d'améliorer la santé et le bien-être des animaux ainsi que la durabilité de ces élevages.

Dans ce but, nous aurons recours à un modèle de mammite chez la souris. Pour cela, une approche innovante en cohérence avec la règle des 3R sera mise en oeuvre. Le suivi de l'infection et de la réponse immunitaire sera réalisé par imagerie in-vivo non invasive. L'imagerie *in vivo*, réalisée avec l'appareil IVIS, permet le suivi dans le temps du processus infectieux grâce à l'utilisation d'une souche de bactérie bioluminescente, ainsi que l'analyse simultanée du recrutement des différentes populations immunitaires rendues fluorescentes, sur le même animal.

Ce modèle permet de s'affranchir de l'inoculation à des animaux d'élevage, protocole qui serait beaucoup plus dommageable.

Cette technique d'imagerie est une méthode très sensible et précise, réalisée sur animaux vivants et non invasive. Elle permet l'obtention d'informations relatives à l'hôte et à l'agent infectieux sur la même souris, tout en conservant les mêmes animaux tout au long de la cinétique de suivi de l'infection. Elle contribue donc grandement au respect de la règle des 3R en réduisant

significativement le nombre d'animaux nécessaires pour réaliser de multiples analyses. Nous utiliserons au total 68 à 80 souris au maximum pour réaliser ces études.

D'autre part, les différentes étapes du protocole sont optimisées pour veiller au respect du bien-être animal et ainsi participer au raffinement de la procédure. Les cages bénéficieront d'un enrichissement adapté (igloo, tunnel et/ou coton). Des anesthésiques peu impactants (isoflurane, kétamine/xylazine) seront utilisés pour limiter au maximum les durées d'anesthésie (qui seront de 10 minutes au maximum par analyse) et de réveil. Le nombre d'analyse sera limité à une ou deux par jour et un suivi régulier des animaux sera effectué pendant toute la durée du protocole. Tout animal présentant des signes de souffrance ou de léthargie sera exclu de l'étude puis euthanasié par dislocation cervicale. En effet, des points limites ont été établis dans ce but en fonction de critères reposant sur l'observation de signes cliniques (niveau d'activité, agressivité, posture, réaction à la manipulation, toilettage, vocalisation) et physio-pathologiques (rythme respiratoire, température, perte de poids, déshydratation, signes d'inflammation).

Une première analyse sur un faible nombre de souris permettra d'ajuster au mieux le protocole et la cinétique pour obtenir suffisamment d'informations tout en limitant au maximum le nombre et la souffrance des animaux.

Cette technique a déjà été utilisée avec succès pour le suivi de processus infectieux, mais le protocole que nous souhaitons mettre en place a un caractère inédit et n'a jamais été publié. Ces projets apporteront donc des informations très utiles pour améliorer la santé et le bien-être des animaux d'élevage.

Ces expériences ont pour but la compréhension du rôle de la protéine SOCS-2 et de l'administration d'alicaments sur la sévérité et l'issue de l'infection, ainsi que sur le recrutement des cellules immunitaires. Ces expériences ne peuvent être réalisées qu'à l'échelle de l'organisme d'animaux vivants et ne peuvent être reproduites *in vitro* puisqu'elles impliquent des interactions entre les différents acteurs du système immunitaire de l'organisme, après contact avec les bactéries en multiplication. Elles permettront ainsi une analyse pertinente et complète du point de vue physiopathologique, dont les résultats seront plus fiables et auront une plus grande probabilité d'être transférables aux espèces de ruminants.

15798 De nombreuses molécules thérapeutiques injectables utilisées dans les traitements contre les cancers ou les maladies métaboliques ont l'inconvénient d'être éliminées rapidement par l'organisme (durée de demi-vie de l'ordre de quelques heures), ou encore de provoquer des réactions immunitaires de type allergique après injections répétées.

Les produits développés dans ce projet consistent en l'encapsulation de ces molécules thérapeutiques à l'intérieur des globules rouges, permettant ainsi leur protection et augmentant leur durée de vie.

L'ensemble des travaux décrits ici (preuve d'efficacité anti-tumorale, études pharmacocinétique/pharmacodynamique, études de toxicité et d'efficacité) constitue un projet complet d'études exploratoires chez la Souris en vue de valider la formulation optimale des produits, ainsi que leur efficacité thérapeutique sur des animaux avec tumeurs. Ces études nous permettront d'alimenter les dossiers réglementaires de demandes d'autorisation d'études cliniques.

Le nombre d'animaux utilisés dans ces procédures (3000 souris au maximum sur 5 ans, pour l'évaluation complète de 6 traitements) est déterminé comme étant le minimum nécessaire pour obtenir des résultats scientifiquement et statistiquement fiables. Aucune méthode *in vitro* alternative ne permet le remplacement des animaux utilisés pour étudier la toxicité éventuelle du produit injecté dans l'organisme.

De même, pour l'efficacité anti-tumorale, les modèles *ex vivo* existants ne s'avèrent pas suffisamment pertinents pour apporter une preuve de concept fiable.

Aucun effet secondaire grave n'est attendu suite aux injections, mais les animaux seront surveillés durant 1 à 2h suivant cet acte, puis observés tous les jours, et pesés régulièrement.

Les procédures exécutées ne provoqueront qu'un inconfort passager et ne nécessiteront qu'une contention légère.

Les animaux porteurs de tumeurs feront l'objet de soins particuliers, et la croissance tumorale sera évaluée très fréquemment, afin de prévenir toute gêne.

Durant l'étude, tout sera mis en œuvre pour minimiser le stress auquel les animaux sont soumis. Les animaux seront hébergés en groupe (sauf animaux incompatibles), et des éléments d'enrichissement du milieu seront mis à disposition blocs à ronger, litière papier pour la confection de nids, etc....

15799 Après une phase de mise au point réalisée en 2016 et 2017, nous souhaitons étendre à l'ensemble de nos protocoles validés la possibilité d'utiliser l'imagerie par résonance magnétique (IRM). Cette technique d'imagerie récente et particulièrement puissante permet une étude fine des organes *in vivo*. Cette étude est particulièrement utile dans le cadre de nos recherches sur la mucoviscidose, les myopathies et de cancérologie. Cette procédure est par définition non-invasif, c'est-à-dire qu'aucun geste n'est pratiqué sur les animaux.

Afin d'assurer une qualité optimale des images obtenues et de réduire au maximum le stress des animaux, ils seront anesthésiés durant la séance d'imagerie. Ce protocole est composé de deux procédures. Une est de classe légère pour le transport des animaux et une deuxième est de classe sans réveil. Les animaux seront mis à mort par élongation cervicale au terme de la séance d'imagerie.

La règle des 3R sera scrupuleusement respectée. Remplacement : Les animaux intégrant cette procédure sont tous issus de nos autres protocoles. Le raffinement sera assuré notamment par des phases d'acclimatation, un enrichissement de l'environnement, un suivi quotidien des animaux ainsi qu'une gestion de la douleur suivant une échelle stricte et des points limites bien établis. Le nombre d'animaux est réduit au minimum tout en permettant des résultats exploitables.

Le nombre total d'animaux sur 3 ans est de 200 souris, les souches retenues sont celles utilisées dans nos autres études.

15800 Les approches d'immunothérapie visant à stimuler la fonction des lymphocytes T (LT) constituent un axe thérapeutique prometteur dans le traitement de nombreux cancers. En particulier, les anticorps ciblant les points de contrôle immunitaire (IC) démontrent actuellement une efficacité clinique supérieure aux lignes de traitements en place précédemment. Bien que ces anticorps aient été validés pour de nombreux cancers et continuent à être testés dans de nombreux protocoles cliniques, les mécanismes moléculaires sous-tendant leur efficacité restent mal compris. Des résultats préliminaires de notre équipe suggère qu'une nouvelle protéine, appelée THEMIS, pourrait moduler l'efficacité des traitements ciblant les IC. Ce projet vise à étudier plus avant l'impact de THEMIS sur la modulation des réponses anti-tumorales des LT et sur l'efficacité des immunothérapies ciblant les IC. Pour cela, nous utiliserons un modèle d'adénocarcinome de colon (MC38) implantés en intra-dermique et un modèle de mélanome (B16K1) implanté en intra-dermique. Nous utiliserons deux modèles de souris génétiquement modifiées déficientes ou surexprimant THEMIS.

Pour l'ensemble du projet qui comprend 4 études distinctes et 4 lots par étude, il est prévu d'utiliser un maximum de 3840 animaux sur 5 ans (960 souris/étude; 240 souris/lot). La règle des 3R sera appliquée dans le cadre de ce projet.

1-Remplacement le recours à l'expérimentation animale dans le cadre de cette étude se fait après de nombreuses études *in vitro* dans des modèles cellulaires montrant l'importance de ce gène d'intérêt dans le fonctionnement du système immunitaire. Le principe de remplacement n'est pas applicable à ce projet car les études *in vitro* ne reproduiraient pas l'ensemble des voies impliquées dans des modèles physiologiques intégrés et par conséquent ne permettent pas l'obtention de résultats scientifiques exploitables et pertinents de la pathologie humaine.

2-Réduction les expériences sont organisées de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux. Le calcul du nombre d'animaux a été basé sur des études similaires à la nôtre et publiées

dans des journaux de référence dans le domaine. Nous estimons que des groupes de 20 souris (10 pour l'analyse clinique et 10 pour l'analyse phénotypique *in vitro*) devraient permettre d'acquérir des données fiables pour cette étude.

3-Raffinement Les conditions d'expérimentations font l'objet d'une procédure de suivi du bien-être animal. Les animaux seront suivis quotidiennement à l'initiation du modèle. Afin de suivre la directive européenne 2010/63/UE, un enrichissement sera rajouté dans les cages, sous la forme de boules de coton, de papiers absorbants, de tubes en carton, permettant aux animaux d'avoir une activité et de faire une nidation. Les animaux seront suivis quotidiennement à l'initiation du modèle. Pour chaque procédure des points limites ont été définis pour limiter la douleur, la souffrance ou l'anxiété de l'animal et l'animal sera euthanasié s'il présente un de ces points limites d'arrêt de la procédure

- aspect général de l'animal (perte de poids supérieure à 20% du poids initial, posture voûtée ou prostrée, vocalisation, tremblement, agressivité, anomalie de la respiration, hypo ou hyperthermie)
- activités anormales de grattage ou de léchage
- signes cutanés (plaies, nécrose, écoulement).

Pour toutes les procédures nécessitant des injections ou des prélèvements répétés, les animaux seront anesthésiés et surveillés jusqu'à leur réveil. Les personnes responsables du projet ont été formées à l'utilisation des animaux à des fins scientifiques elles garantissent la formation et de l'encadrement des autres expérimentateurs impliqués dans les procédures expérimentales. L'apprentissage et la maîtrise des gestes techniques sont reportés dans les livrets de compétences des personnes concernées.

15801 Les habitudes alimentaires ont considérablement évolué ces 50 dernières années notamment dans les pays du Sud et ont vu l'alimentation traditionnelle principalement basée sur des aliments d'origine végétale remplacée par une alimentation à fort pouvoir énergétique essentiellement d'origine animale. Ce bouleversement du comportement alimentaire joue un rôle essentiel dans l'augmentation considérable de la prévalence de maladies chroniques d'origine nutritionnelle liées au syndrome métabolique : obésité, diabète, maladies cardio-vasculaires entre autres. Les effets santé des aliments d'origine végétale liés à l'extraordinaire richesse en micro-nutriments de la biodiversité sont de plus en plus recherchés face à ce fléau qui affecte tout autant les pays industrialisés que les pays du Sud du fait de la sédentarisation des populations. Dans le cadre d'une alimentation saine et responsable, l'optimisation des procédés de transformation des aliments d'origine végétale doit prendre en compte, en plus des attributs classiques des qualités sanitaire, nutritionnelle et sensorielle, la qualité fonctionnelle de l'aliment qui peut agir sur la santé et le bien-être du consommateur. Ces effets santé de certains aliments sont actuellement très prisés comme en témoignent les campagnes de presse type « Manger 5 fruits et légumes par jour ». Un modèle classique de syndrome métabolique est le rat dont le régime alimentaire est enrichi par du fructose ajouté à l'eau de boisson. Ce modèle permet en quelques semaines de développer les anomalies du syndrome métabolique. Nous étudions différentes matrices alimentaires : jus de fruit, jus de légumes, extraits d'aliments, principalement des pays du sud (Afrique, Asie, Amérique latine). Nos études prennent en compte la règle des 3R (Remplacer, réduire et raffiner) : (1) Remplacer l'usage des animaux le remplacement de l'animal par une autre méthode n'est pas possible pour évaluer le bénéfice d'un aliment car il n'existe pas de méthode alternative à l'organisme entier, cependant pour nous ne testons que les produits dont nous avons prouvé les effets santé sur des modèles non animaux du type culture cellulaire, (2) Réduire le nombre d'animaux : nous réduisons le nombre d'animaux utilisés en utilisant le minimum de sujets nécessaires à exploiter les résultats soit 20 rats qui sont nécessaires et suffisants ce type d'étude sur un produit alimentaire. Nous prévoyons d'étudier au maximum 3 matrices alimentaires par an soit un nombre total de 300 rats sur une période de 5 ans, (3) Raffiner les méthodes de travail pour le bien-être des animaux : des cages de grande taille sont utilisées avec maximum 3 animaux par cage. L'environnement des animaux est également enrichi avec des bâtonnets de bois pour que le comportement des rongeurs puisse s'exprimer plus naturellement. Ce modèle est peu impactant sur l'animal mais nous vérifions les animaux quand même les animaux 2 fois par jour. Tout signe éventuel d'inconfort, de douleur ou

de détresse (points limites) sera immédiatement pris en charge. Il s'agit d'une perte de poids (> 20%), de déshydratation, d'hyperactivité, d'isolement des individus, d'une indifférence par rapport au milieu extérieur, de tremblements, d'agressivité, d'un pelage non soigné, de blessure(s) ou d'automutilations, de dos voûté, qui conduiront au sacrifice (pentobarbital 200 mg/kg ip). Dans le cas d'un inconfort, d'une douleur ou d'une détresse n'atteignant pas un des points limites, les méthodes recommandées de prise en charge de l'animal pharmacothérapeutiques ou non pharmacothérapeutiques seront immédiatement appliquées. Sur le plan pharmacothérapeutique, nous disposons des sédatifs, analgésiques et anesthésiques adaptés afin de soustraire immédiatement l'animal à son état.

15802 Les désordres vestibulaires sont des pathologies liées en premier lieu à des atteintes du vestibule, organe de l'équilibration localisé dans l'oreille interne. Ces pathologies se caractérisent par des sensations de vertige, des déficits posturo-locomoteurs pouvant conduire à des chutes, des mouvements incontrôlés de l'œil, ainsi que des altérations cognitives. Ils sont souvent accompagnés de nausées et de vomissements. Ces symptômes peuvent avoir des causes multiples, tels que des accidents vasculaires cérébraux, des infections ou des traumatismes de l'oreille, ou encore des atteintes ototoxiques. Ils peuvent aussi résulter tout simplement du vieillissement normal de l'oreille interne. La prévalence des désordres vestibulaires est importante puisqu'elle représente 3 % de l'ensemble des pathologies chez les plus de 50 ans et près de 1 % des urgences hospitalières. La prise en charge thérapeutique des désordres vestibulaires associe approches pharmacologiques et traitements par physiothérapie. Les solutions pharmacologiques restent peu efficaces par manque de spécificité.

L'Apamine, un antagoniste des canaux potassiques activés par le calcium de faible conductance (canaux SK), a démontré un potentiel antivertigineux sur un modèle de neurectomie vestibulaire unilatérale (NVU) chez le chat. L'objet du présent projet est d'explorer en détail cette propriété afin de déterminer la potentielle orientation de l'Apamine comme un médicament candidat contre les désordres vestibulaires.

L'étude sera réalisée sur deux modèles chez le rat reproduisant les symptômes de la pathologie humaine un modèle ototoxique d'administrations transtympaniques d'arsanilate (modèle TTA) et un modèle chirurgical de section du nerf vestibulaire (NVU). Les effets antivertigineux du composé testé seront évalués grâce à des tests posturo-locomoteurs adaptés.

Un total de 618 rats adultes mâles sera nécessaire pour atteindre les objectifs de ce projet qui se résument à 1/ évaluer l'effet antivertigineux de l'Apamine (détermination des doses et fenêtres thérapeutiques les plus efficaces), 2/ comprendre son mode d'action et 3/ déterminer la voie d'administration la plus pertinente pour un potentiel passage en clinique.

Afin de répondre à la règle des 3R 1/ Réduction Les différents tests comportementaux seront réalisés sur les mêmes animaux, réduisant ainsi le nombre total de rats à utiliser pour ce projet. Le nombre de rats par groupe a été déterminé en se basant sur notre expertise dans le domaine de la pathologie vestibulaire et celle de nos partenaires sous-traitants afin d'obtenir des résultats statistiquement exploitables et fiables. 2/ Raffinement Une période d'acclimatation d'une semaine sera appliquée avant le début des tests. Les TTA et NVU seront réalisés sous anesthésie à l'isoflurane et la température des animaux sera contrôlée tout le long de la procédure. Afin de garantir une couverture analgésique, la Buprénorphine (BupreCare 0.05 mg/kg, sous-cutanée) sera administrée en période de pré- et post-opératoire. Les animaux seront également injectés avec une solution physiologique avant le réveil visant à suppléer au déficit d'hydratation qui pourrait survenir dans les 24h après la lésion vestibulaire. En période post-opératoire, les animaux seront suivis de près et feront l'objet d'une surveillance quotidienne par le porteur du projet ainsi que les zootechniciens. Ils auront également accès à une nourriture riche en calories et seront hébergés dans des cages enrichies. 3/ Remplacement Il n'est pas possible pour le moment de remplacer le modèle animal pour évaluer l'effet antivertigineux d'un composé pharmacologique. Nous avons besoin d'un ensemble complexe d'organes que nous ne pouvons reproduire via des modèles *in vitro*.

Les données recueillies au cours de cette étude serviront de base aux études précliniques réglementaires qui conditionneront un potentiel passage en clinique de l'Apamine comme médicament candidat contre les symptômes des désordres vestibulaires.

15803 La prévalence de l'insuffisance cardiaque est très élevée dans le monde elle serait comprise entre 1 et 2 % dans les pays développés. En France, on recense chaque année près de 70 000 décès liés à l'insuffisance cardiaque, et plus de 150 000 hospitalisations. Environ la moitié de ces patients présente une insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée (ICFEP), proportion qui augmente d'environ 1% par an au détriment de l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection réduite (ICFER). L'ICFER est un type d'insuffisance cardiaque qui fait suite à un infarctus du myocarde. Cet événement mène à la mort d'une partie du tissu cardiaque et à une réduction de la capacité du cœur à éjecter un volume de sang suffisant. L'ICFEP, à l'inverse, ne présente pas de perte de tissu cardiaque mais une altération structurelle et une atteinte de la phase de relaxation du cœur.

Notre projet a pour but d'étudier, chez la souris, l'implication de deux facteurs, CHC22 et VSIG4, dans la régulation des mécanismes impliqués dans l'occurrence de l'ICFEP et/ou de l'ICFER. Ce projet d'une durée de 5 ans comporte 6 procédures qui impliqueront 2800 souris au total. Des souris génétiquement modifiées nous permettront d'analyser le rôle de ces protéines. Ces animaux subiront un infarctus du myocarde (modèle expérimentale de ICFER) ou un traitement combinant l'administration d'un régime enrichi en graisse et d'un inhibiteur pharmacologique de l'enzyme produisant du monoxyde d'azote (modèle expérimental de ICFEP). L'analyse consistera à étudier la fonction cardiaque, le remodelage cardiaque et la réponse inflammatoire. Pour respecter le principe des 3R, nous utiliserons des méthodes alternatives *in vitro* lorsqu'il sera possible de les appliquer. Le nombre d'animaux utilisé sera réduit par l'utilisation de tests statistiques déterminant la taille minimale des groupes expérimentaux. Enfin, la souffrance animale sera réduite au maximum par le raffinement des méthodes expérimentales notamment l'utilisation d'anesthésie et d'analgésique adaptée durant les procédures, et l'établissement de points limites adéquats.

A terme, les résultats de ce projet permettront de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la survenue de l'insuffisance cardiaque et pourraient, de fait, permettre le développement de nouvelles approches thérapeutiques chez les patients insuffisants cardiaques.

15804 Le diabète de type 1 ou diabète insulino-dépendant est la maladie chronique la plus fréquente de l'enfant et concerne également l'adolescent et l'adulte jeune. Il s'agit d'une maladie auto-immune causée par un comportement anormal du système immunitaire qui agresse les organes de son hôte. Ainsi, des cellules de l'immunité, les lymphocytes T de l'individu, détruisent les cellules bêta des îlots de Langerhans du pancréas productrices d'insuline, l'hormone indispensable à la régulation du glucose dans l'organisme. Dans les pays industrialisés le diabète insulino-dépendant est un problème majeur de santé publique car la fréquence de la maladie augmente de manière très importante et régulière et concerne des patients de plus en plus jeunes (moins de 5 ans d'âge). Actuellement, la prise en charge des patients se fait par l'administration quotidienne et à vie d'insuline pour remplacer l'hormone manquante, un traitement qui a des effets secondaires vasculaires et neurologiques majeurs à long terme et, surtout, qui ne traite pas la cause de la maladie.

Pour développer des thérapeutiques qui ciblent la(es) cause(s) du diabète de type 1 il est important d'analyser de manière précise les mécanismes conduisant au dérèglement de l'immunité qui font intervenir des facteurs génétiques et environnementaux dont les bactéries de l'intestin ou microbiote intestinal.

Il n'existe pas de modèles *in vitro* ou *in silico* permettant d'aborder ce sujet complexe, où de nombreux paramètres physiopathologiques entrent en jeu et impliquent différentes cibles cellulaires dont les cellules de l'immunité et/ou des îlots de Langerhans du pancréas. Il est donc indispensable d'avoir recours au modèle *in vivo* de la souris NOD (non-obese diabetique) qui développe spontanément un diabète de type 1 récapitulant de manière fiable la maladie humaine. Notre projet propose d'étudier deux sous-lignées de souris NOD qui expriment une susceptibilité différente, faible ou élevée, à développer le diabète insulino-dépendant.

Le but est d'identifier chez ces souris le(s) gène(s) responsables de la différence d'incidence de la maladie. Cette étude sera faite en croisant les souris des deux sous-lignées pour ensuite analyser individuellement les souris de la descendance (pendant 40 semaines) afin de déterminer pour chaque individu le moment de survenue du diabète et son profil génétique.

Nous allons également préciser si la différence de diversité de composition du microbiote intestinal qui existe entre les deux sous-lignées de souris NOD a un impact sur la différence d'incidence de la maladie. Pour ce faire des expériences de greffe de microbiote intestinal seront pratiquées par gavage entre les individus des deux sous-lignées et l'incidence du diabète sera suivie chez les différents groupes d'hôtes greffés.

Enfin, la différence de progression de la maladie chez les deux sous-lignées de souris sera suivie (pendant 40 semaines) grâce au dosage dans le sang d'anticorps anti-insuline, reconnus comme un marqueur de la destruction auto-immune des cellules bêta, grâce à une nouvelle technique plus sensible que celles disponibles jusque-là.

Les animaux seront surveillés de près lors de toutes les procédures. Afin de limiter la souffrance et l'angoisse des animaux certaines procédures seront réalisées sous anesthésie générale ou analgésie. La procédure de gavage n'est pas douloureuse et sera réalisée par un personnel formé ayant de l'expérience de cette pratique.

Des points limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de la souris avant l'apparition d'une détérioration physique. Ainsi l'apparition des premiers signes biologiques du diabète auto-immun, à savoir une glycosurie associée à une hyperglycémie confirmée à 7 jours d'intervalle, entraînera un arrêt de l'expérimentation et la mise à mort des animaux avant la manifestation clinique de la maladie.

Toutes les mesures seront prises pour que pendant le temps de suivi des animaux un confort maximum soit respecté pour leur hébergement un enrichissement avec du coton et des morceaux de bois tendre sera utilisé.

Le nombre total des souris nécessaires pour la réalisation de ce projet, dont la durée sera de 4 ans, est évalué à 1816. Pour réduire le nombre d'animaux, nous avons estimé la taille des échantillons permettant une analyse statistique fiable des résultats grâce aux données recueillies au cours des expériences antérieures. Par ailleurs, en fonction des résultats obtenus afin de répondre à des questions de biologie cellulaire et moléculaire, des modèles *in vitro* seront utilisés pour réduire le nombre d'animaux. Des suivis longitudinaux seront pratiqués, chaque individu étant ainsi son propre témoin afin de limiter les effectifs.

L'intégration adéquate des résultats issus de ce projet conduira à l'identification de mécanismes immunologiques prédictifs de la survenue et de la progression de la maladie, transposables à la situation humaine, qui sont autant de cibles potentielles pour établir des thérapies curatives.

15805 L'électrotransfert est une technique permettant d'introduire un gène d'intérêt dans un tissu pour qu'il produise une protéine médicament. Cette technique est largement utilisée et fait partie des techniques de transfert de gène les plus rapides et efficaces.

Nous avons développé une thérapie basée sur cette technique pour traiter les maladies de l'œil en utilisant le muscle ciliaire (seul muscle situé à l'intérieur de l'œil) comme tissu « producteur » des protéines médicaments. Ceci a nécessité le développement d'un dispositif oculaire permettant de cibler et de standardiser les étapes d'injection et de transfert de gène dans ce tissu. Le développement du dispositif oculaire utilisé actuellement dans nos essais cliniques a été réalisé chez le lapin car l'œil de lapin a une taille similaire à celle de l'œil humain. Il est ainsi facile de transposer un dispositif médical du lapin à l'homme.

Suite à l'avancée des essais cliniques, l'objectif de notre projet est de faire évoluer le dispositif oculaire et donc de réaliser des optimisations chez le lapin. Il s'agira donc d'évaluer (i) les modifications du design du dispositif oculaire en testant différents prototypes et (ii) de nouvelles séquences électriques adaptées à ces nouveaux designs.

L'ensemble du projet durera 3 ans et nécessitera l'utilisation de 190 lapins.

Ce projet a été développé en respectant la règle des 3R. Il nécessite d'avoir recours à des animaux vivants pour montrer que, via notre technologie, la protéine cible est efficacement produite, qu'elle diffuse depuis le muscle ciliaire jusqu'au tissu à traiter. Les procédures mises en place pour réaliser le projet sont peu traumatiques, de courtes durées et réalisées sous anesthésies générale et locale (classe de gravité modérée). Ces procédures sont standardisées afin de pouvoir réduire le nombre d'animaux à utiliser et obtenir des résultats statistiquement exploitables. De plus, nous avons choisi de traiter les 2 yeux afin de limiter le nombre d'animaux. Avant toute manipulation, les animaux seront placés en cage individuelle avec un environnement enrichi et stabulés au minimum une semaine dans leur nouvel environnement afin d'éviter le stress. Leur état de santé sera contrôlé une fois par jour par le personnel de l'animalerie. Des points limites ont été identifiés afin de minimiser l'inconfort, la souffrance ou la détresse potentiels des animaux et de mettre en place la conduite à tenir.

15806 A l'heure actuelle, le cancer fait partie des principales causes de mortalité en France et plus globalement dans le monde. En France métropolitaine, on estimait en 2018 à 382 000 le nombre de nouveaux cas de cancers, et à 157 400 le nombre de décès. Bien que ces chiffres soient globalement en baisse depuis plusieurs années, certains types de cancer conservent des pronostics particulièrement mauvais. Par exemple, le cancer du poumon est un des types de cancers les plus répandus dans le pays, mais également celui dont le taux de survie est le plus bas. Malgré les progrès effectués en recherche ces dernières années, les conditions de vie des patients touchés par ce cancer ne s'améliorent pas réellement. Il fait donc partie des axes de recherche prioritaires en matière de thérapies anticancéreuses. De même, le cancer des voies aérodigestives ou ORL (bouche, pharynx, larynx notamment) est un des plus répandus en France, et également un de ceux ayant la plus forte mortalité. De manière générale, ces deux types de cancer peuvent être traités par radiothérapie, immunothérapie, voire une combinaison de ces deux méthodes.

La radiothérapie est, après la chirurgie, le traitement actuellement le plus utilisé pour combattre le cancer. Ces dernières années ont vu naître l'essor des immunothérapies, qui sont des traitements ciblant l'activité de molécules précises impliquées dans la réponse immunitaire anti-tumorale. Bien que l'utilisation de ce seul type de thérapie ne soit pas toujours efficace, il a été prouvé que son association à la radiothérapie pouvait améliorer l'efficacité anti-tumorale de la radiothérapie dans certains types de cancers. Il semblerait que l'avenir de la recherche de traitements anti-cancer réside dans les thérapies combinées, qui pourraient avoir des actions synergiques.

La radiothérapie permet de tuer une partie des cellules tumorales, ce qui a pour effet d'activer partiellement le système immunitaire et peut conduire à l'infiltration de lymphocytes T dans la tumeur. L'activité anti-tumorale de ces cellules immunitaires peut être amplifiée grâce à certaines immunothérapies, telles que celles ciblant PD-1. PD-1 est un récepteur protéique, situé à la surface des lymphocytes T, sur lequel se fixe le ligand PD-L1, pouvant être exprimé à la surface des cellules tumorales. Cette liaison entraîne l'inactivation des lymphocytes T, annulant leur activité et leur potentiel anti-tumoral. L'immunothérapie ciblant cet axe permet donc d'éviter cette inactivation, et de conserver l'activité de cette partie du système immunitaire. Cependant, certains types de cancers présentent une résistance aux thérapies ciblant l'axe PD-1-/PD-L1. Nous prévoyons d'évaluer ici une nouvelle molécule qui, combinée au traitement radiothérapie/immunothérapie anti-PD1, pourrait potentiellement éliminer cette résistance. Ceci permettrait ainsi d'améliorer les traitements actuels.

Pour ce faire, le projet nécessite l'utilisation d'organisme vivant, disposant d'un système immunitaire. En effet, il n'existe pas à l'heure actuelle de modèle *in vitro* permettant de simuler de telles conditions dans le cadre de notre étude. De plus, la radiothérapie entraîne des modifications conséquentes du microenvironnement tumoral, ainsi que du système immunitaire, ce qui ne peut être reproduit *in vitro*. Enfin, l'intégration de ce traitement dans un organisme complexe et complet permet de se rapprocher au mieux des conditions réelles de traitement observées chez les patients, en gardant à l'esprit que nous sommes dans le cadre d'un modèle animal.

Pour mener à bien ce projet et avoir une idée précise du potentiel en thérapeutique humaine de cette nouvelle combinaison, 1220 souris seront nécessaires sur 4 années d'étude. Cette estimation

se base sur des analyses statistiques qui permettent de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés dans cette étude. Le suivi longitudinal des animaux par imagerie sous anesthésie (méthode non invasive et raffinée permettant d'obtenir des données pertinentes sur l'animal vivant) permettra de réduire le nombre d'animaux utilisés (augmentation de la puissance statistique, et animal son propre témoin pour certains paramètres). Diverses stratégies permettent de limiter un maximum le stress et la souffrance des animaux. Des points limites précoces ont été élaborés, et ils seront strictement appliqués. Leurs conditions de vie seront par ailleurs toujours les plus apaisantes possible, avec de l'enrichissement comme des nids ou des rouleaux en carton. Les procédures expérimentales seront faites après anesthésie. Les animaux recevront un aliment riche et appétent de récupération en cas de problème. Les animaux seront observés quotidiennement pour détecter tout signe éventuel de contrainte ou de toxicité des traitements.

15807 La maladie hépatique grasse non alcoolique (NAFLD) devient rapidement la cause la plus fréquente de maladie hépatique chronique en raison de l'augmentation de la prévalence de l'obésité et du diabète dans les pays occidentaux. Actuellement aucun agent de traitement pharmacologique est approuvé pour la NAFLD et la NASH (stéatose hépatique non-alcoolique) et les traitements anti-diabétiques restent lourds pour les patients. NAFLD est caractérisée par la stéatose hépatique, en l'absence de causes d'accumulation secondaire de graisse hépatique. La présence de stéatose et d'inflammation liées aux dommages hépatocytaires et fibrose sont caractéristiques de la NASH. Du à la complexité de ces maladies, ce projet vise à mettre en place les différents modèles animaux afin de reproduire ces maladies avec l'objectif d'identifier et de tester des nouvelles molécules thérapeutiques. A ce jour, nous ne disposons d'aucune molécule de traitement pour la NASH.

Avec cet objectif les études comptent utiliser environ 7450 souris et 2000 rats afin de pouvoir tester des différentes molécules thérapeutiques et avoir une approche plus réaliste de l'impact de ces molécules sur la santé humaine. Durant toutes les procédures d'expérimentations animales (induction de la maladie + traitements), le principe des 3R est appliqué de manière consistant et routinière.

-Réduire les études seront menées de manière objective et claire pour évaluer l'impact des molécules thérapeutiques en utilisant le minimum nécessaire d'animaux pour rendre le résultat fiable statistiquement.

-Remplacement différents modèles *in vitro*, telles que des lignées cellulaires, disponibles visent réduire l'appel à l'animal à chaque nouveau test. La sélection des différentes molécules peut être réalisée préalablement *in vitro*.

-Raffinement Les procédures décrites dans ce projet sont choisies et réalisées de manière éthique afin de réduire ou supprimer les douleurs particulières aux animaux. Tous les animaux sont hébergés dans des cages aux dimensions adaptée à la quantité d'animaux hébergé, ainsi que à la présence de matériaux pour l'enrichissement en accord avec la législation européenne. Les personnes responsables pour le traitement et suivi des animaux font de sort à éviter le stress. Les animaux sont suivis quotidiennement et pesés au moins une fois par semaine afin d'identifier au plus tôt un état clinique anormal. Les problématiques relevées lors des observations cliniques des animaux sont répertoriés (tel que perte de poids, défaut de toilettage, agressivité, immobilité,) et revues systématiquement par les membres de la structure chargée de bien-être des animaux (SBEA). Le vétérinaire est consulté pour la mise en place des actions correctives et d'améliorations. Lorsqu'il s'avère nécessaire, une procédure en relation avec l'état clinique (détaillé plus bas) est mise en œuvre afin de diminuer la souffrance des animaux. Si l'allègement de la souffrance n'est pas observé, l'animal sera sacrifié en utilisant des procédures appropriées.

15808 La transplantation hépatique est pratiquée pour les hépatopathies graves telles que le carcinome hépato-cellulaire. Elle apparaît comme l'ultime étape de guérison pour ces patients. Depuis de nombreuses années maintenant, le principal problème est la pénurie de greffon en raison du faible pool de donneurs. C'est pourquoi aujourd'hui afin de traiter le plus de patients possibles inscrit sur une liste d'attente, les chirurgiens spécialisés en transplantation d'organes ont recours aux greffons dits « marginaux », c'est-à-dire issu d'un donneur plus âgé, d'un greffon présentant une stéatose,

etc. La stéatose hépatique est l'accumulation de triglycérides dans le cytoplasme des hépatocytes. L'utilisation de greffons provenant d'un foie stéatosé est un facteur de complication de la transplantation hépatique augmentant le risque que le greffon ne fonctionne pas, en augmentant le risque de la perte du greffon. Le but de ce projet de recherche est de mettre au point un modèle murin de stéatose hépatique afin de pouvoir tester un ensemble de thérapies innovantes. Le recours à l'animal pour cette étude est incontournable afin d'évaluer les effets de la stéatose sur la fonction hépatique. Ceci ne peut pas être évalué avec un organe isolé et nécessite donc un modèle *in vivo*. Nous avons choisi le modèle murin qui représente le plus petit modèle animal sur lequel la mise en place d'une stéatose est réalisable et bien documentée (3R Remplacement).

Le projet sera réalisé sur 30 souris mâles C57BL6J âgées de 6 à 12 semaines des contrôles ainsi que des mâles soumis à un régime carencé en choline et méthionine durant de 2 à 4 semaines. Ce nombre nécessaire d'animaux a été calculé pour permettre une étude statistique fiable (3R Réduction). Les animaux seront hébergés par groupe de 5 afin de diminuer le stress des animaux, dans des cages ventilées par air filtré, avec enrichissements à types de copeaux, nids et tunnels, alimentation et eau ad libitum. Lors des examens d'imagerie, les animaux seront sous anesthésie générale, une compresse humide et du gel oculaire (Ocrygel) seront appliqués sur les yeux pour protéger les cornées de l'animal. Les animaux feront l'objet de visites et contrôles quotidiens par du personnel formé et qualifié, et l'absence d'atteinte de point limite sera surveillée (3R Raffinement). L'identification et la quantification de la stéatose hépatique se fera sur les 3 groupes d'animaux par IRM (imagerie par résonance magnétique) et couplée par des évaluations biologiques et géniques.

15809 La médecine de précision a rejoint l'arsenal thérapeutique de la lutte contre le cancer avec, entre autres, l'apparition de l'immunothérapie et, plus précisément, des inhibiteurs de point de contrôle qui déverrouillent l'action du système immunitaire dans sa lutte contre les tumeurs. Afin de potentialiser les effets des inhibiteurs de contrôle et grâce au développement du séquençage à haut débit d'acides nucléiques comme l'ADN, la recherche contre le cancer a récemment porté son attention sur des protéines anormalement formées, appelées néoantigènes, qui apparaissent dans les cancers à cause du fort taux de mutation.

C'est dans ce cadre que nous développons une formulation innovante dans le traitement du cancer, alliant des inhibiteurs de point de contrôle immunitaire et des néoantigènes spécifiques de chaque patient. Les résultats d'ores et déjà obtenus par utilisation de notre formulation par voie sous-cutanée sont très prometteurs. Nous souhaitons maintenant comparer l'efficacité de notre formulation en fonction de la voie d'administration utilisée. Pour cela, nous réaliserons d'une part une administration sous-cutanée et d'autre part un traitement épicutané grâce à une rupture mécanique de la barrière cutanée sous forme de micropores. Dans ce dernier cas, nous générons les micropores à l'aide d'une technologie laser quasi indolore et utilisée dans la sphère médicale sur l'humain nous appliquons alors notre formulation dissoute sur la zone microporée afin que celle-ci puisse pénétrer à travers la peau et provoquer l'activation du système immunitaire.

Cela commencera par une première étape d'optimisation des micropores où plusieurs paramètres de la réponse immunitaire seront analysés après sensibilisation à l'ovalbumine, un antigène classiquement utilisé en immuno-oncologie. Cette phase pilote nécessitera l'utilisation de 12 groupes de 6 souris et les expériences menées pourront être réalisées 3 fois pour un total de 216 animaux. Une fois les paramètres optimisés, nous réaliserons une étude d'escalade de dose dans un contexte thérapeutique sur des souris porteuses de tumeurs sous-cutanées et traitées avec un anticorps anti-PD1 inhibiteur de point de contrôle immunitaire. Pour cela, nous injecterons des cellules de mélanome en sous-cutané à 9 groupes de souris puis les traiterons avec des doses croissantes de notre formulation par voie sous-cutanée ou épicutanée. Cette phase nécessite donc l'utilisation de 54 souris et pourra être réalisée 3 fois pour réaliser le suivi tumoral des animaux et 3 fois pour étudier la réponse immunitaire sous-jacente, demandant donc un total de 324 animaux, dont 162 pour étudier le suivi tumoral des animaux et 162 afin d'étudier la réponse immunitaire sous-jacente. L'ensemble du projet comprend donc 540 animaux. Le projet sera mené dans le respect de la règle des 3 R.

Remplacement Les phénomènes à l'œuvre dans la réponse immunitaire mettent en jeu différents organes et réseaux cellulaires et moléculaires. Cette complexité rend nécessaire l'utilisation d'expériences *in vivo* pour évaluer et comprendre les phénomènes mis en jeu.

Réduction Des groupes de 6 souris seront utilisées afin de satisfaire aux prérequis statistiques permettant d'obtenir une puissance satisfaisante sur les tests qui seront réalisés grâce à l'estimation de variabilité obtenue grâce aux résultats précédents.

Raffinement Les traitements topiques seront réalisés sous anesthésie générale. La rupture de la barrière épidermique par génération de micropores est une opération quasi indolore et les micropores formés se résorbent rapidement après 24 à 48h. La surveillance des animaux se fera tous les deux jours pendant la sensibilisation, notamment visuellement par le suivi de l'aspect général de l'animal, sa posture et son comportement. Des points limites ont été établis permettant d'interrompre les procédures limitant ainsi la souffrance animale à son minimum. Si un animal est déclaré en souffrance après évaluation alors des mesures correctives appropriées seront prises après avis vétérinaire.

15810 CONTEXTE : Les arythmies cardiaques sont souvent sans conséquence et peuvent survenir brièvement chez des sujets sans pathologie, sans être ressenties ou en étant ressenties comme un frémissement ou une accélération très courte du rythme cardiaque. Dans certains cas cependant, les symptômes sont prolongés, sévères ou récidivants et peuvent exiger un traitement rapide et sur le long terme. Les symptômes ressentis varient selon la santé du cœur, le type d'arythmie sa fréquence et sa durée. L'arythmie peut provoquer de la fatigue, de l'essoufflement, des étourdissements pouvant aller jusqu'à la perte de conscience. Certaines arythmies rares peuvent être dangereuses et peuvent causer la perte de conscience ou même la mort subite (50000 morts par an).

Dans le cas des arythmies résistantes aux traitement médicamenteux, l'ablation du ganglion stellaire a montré de bons résultats. Mais cet acte chirurgical étant effectué dans une zone délicate, des effets secondaires sont observés. Les HIFU (ultrasons focalisés à haute intensité) permettent de cibler une zone à travers des tissus et de détruire cette zone sans toucher les tissus traversés. Cette technique est déjà utilisée dans la destruction de tumeurs. La sonde HIFU utilisée ici permet de viser des petites structures et d'effectuer un contrôle échographique en temps réel.

OBJECTIF : Dans l'optique de mettre au point un traitement de destruction du ganglion sans chirurgie à base d'ultrasons, nous souhaiterions évaluer le porc comme modèle expérimental.

Le but à long terme serait de mettre au point un traitement définitif non invasif sans anesthésie de l'arythmie.

TYPE DE PROJET/PROCEDURES/EXPECE ANIMALE/SORT DE L'ANIMAL

Ce projet de recherche translationnelle mettra en œuvre 2 porcs dans une procédure sans réveil ce qui est suffisant pour évaluer ce modèle. L'animal subira, sous anesthésie et après mise en place d'un cathéter carotidien, un traitement HIFU indolore de quelques secondes sous contrôle échographique.

CONFORMITE AVEC LES 3R

Remplacement : Au préalable des repères anatomiques et un essai *ex vivo* sur cadavre issu d'un autre projet aura été réalisé afin de réduire le nombre d'animaux pour l'évaluation du modèle.

Réduction : Deux animaux sont prévus mais si dès le premier animal il est possible de conclure, le 2ème ne sera pas utilisé. Un traitement HIFU sera également effectué sur la vessie pour la phase préliminaire d'un autre projet sans réveil au cours de la même anesthésie qui ne durera pas plus de 4 heures.

Raffinement : Les gestes techniques seront effectués par un chirurgien maîtrisant le modèle porcin. L'animal sera monitoré ce qui permet d'affiner l'évaluation de l'anesthésie.

15811 Cinq millions de personnes ont besoin annuellement de pansements cicatrisants pour le traitement des plaies (brûlures superficielles ou profondes, escarres et ulcères de jambes de patients diabétiques, par exemple).

Bien que de nombreux pansements destinés à favoriser la cicatrisation cutanée soient actuellement sur le marché, de multiples problèmes subsistent dans la prise en charge des cas les plus compliqués pour lesquels le rôle de barrière de la peau contre les infections n'est plus assuré.

De plus, certaines plaies chroniques peuvent présenter des infections avec des micro-organismes organisés en biofilm. Ce dernier rend les bactéries peu sensibles aux antibiotiques et aux traitements locaux, et la cicatrisation se trouve altérée.

L'objectif de ce projet est de développer des molécules ou dispositifs innovants, et favorisant une cicatrisation rapide, même de plaies chroniques, saines ou infectées.

Pour cela au maximum 290 porcs et 820 rats seront utilisés : ce nombre est le strict minimum pour obtenir des résultats interprétables, et permettra le développement de différents traitements ou dispositifs médicaux sur 5 ans.

Le nombre d'animaux pourra être réduit fortement si les résultats obtenus sont satisfaisants ou si moins de traitements sont mis au point.

Ces produits seront d'abord testés sur des peaux synthétiques ou des cultures cellulaires. Ceux considérés comme sûrs sont ensuite évalués sur animaux, car le suivi des différentes étapes permettant la cicatrisation d'une plaie, implique diverses molécules, différents types cellulaires, et des mécanismes de contraction de la peau, qui ne sont pas reproductibles *in vitro*.

Seules des études chez l'animal vivant permettent de réunir tous ces paramètres complexes et d'observer l'évolution de la cicatrisation au fil du temps.

La mise en place de modèles de plaies cutanées est délicate et nécessite une prévention attentive de la douleur des modèles animaux et un suivi régulier des pansements, qui se fait sous anesthésie pour limiter le stress.

Les rats et les porcs sont des animaux sociaux : on leur assurera un contact avec leurs congénères tout au long des travaux, malgré les pansements. Ils seront hébergés dans des cages adaptées et équipées de matériel d'enrichissement pour limiter l'ennui avec contacts réguliers avec le personnel. Tous les gestes techniques seront effectués par du personnel entraîné spécifiquement pour le travail avec ces espèces animales.

Les perspectives offertes par ce projet sont une meilleure prise en charge des cas de plaies dont la cicatrisation est difficile (escarres, plaies infectées par un biofilm bactérien), mais aussi le développement de solutions adaptées au traitement des grands brûlés.

15812 Notre projet vise à étudier les mécanismes impliqués au cours du stress métabolique et du vieillissement au sens large chez le poisson zèbre. Très récemment, le poisson zèbre (ZBF), *Brachydanio rerio*, émerge comme un nouveau modèle animal pour étudier les maladies inflammatoires et/ou métaboliques, avec de très nombreuses composantes physiopathologiques qui sont retrouvées dans la mise en place de pathologies chez les mammifères. Le ZBF est un vertébré de deux à trois centimètres de longueur qui est codé par environ 26000 gènes dont 85% sont présents chez l'homme et actuellement le patrimoine génétique du ZBF est le plus imposant jamais décrypté chez un vertébré. Le poisson zèbre produit un grand nombre de descendants, et se développe très rapidement. Et comme la souris, cet organisme est génétiquement modifiable et permet des études de grandes envergures de la même portée tout en étant plus rapides que celles menées chez le rongeur. En effet grâce à sa transparence (au stade larvaire) et sa petite taille, un nombre quasi indéfini d'événements biologiques sont monitorables par des approches non invasives et quantitatives. Actuellement vu la recrudescence des études chez le ZBF dans tous les champs de la biologie, un très grand nombre de lignées transgéniques ont été générées et sont disponibles dans la communauté scientifique, et permettent de répondre à de vraies questions biomédicales. Schématiquement, nous manipulerons les gènes cibles auxquels nous nous intéressons au laboratoire, qui seront soit rendus silencieux soit fortement surexprimés pour évaluer

les effets biologiques générés sur la progression du stress métabolique et/ou du vieillissement. Dans le cadre de ce protocole nous comptons manipuler une quinzaine de gènes et générer au total 30 lignées transgéniques. Ces manipulations génétiques combinées à la puissance exploratoire du modèle poisson zèbre font de ces poissons un modèle unique pour étudier de manière intégrée le rôle de nos cibles d'intérêts dans la progression du stress métabolique et du vieillissement (principe de remplacement). Compte tenu de la variabilité des paramètres biologiques généralement observée au sein d'un groupe homogène et de la durée des protocoles, des groupes de 30 animaux seront formés afin de pouvoir mettre en évidence des différences statistiques (principe de réduction). L'étude nécessitera au total 11100 animaux. Les poissons adultes seront hébergés selon les règles internationales en vigueur, à la densité de 5 spécimen par litre d'eau. Les lignées sauvages et transgéniques de poissons utilisées dans cette étude, sont toutes sur fond génétique AB/TL, classiquement utilisé dans les études du métabolisme et du vieillissement, dont les mâles répondent très bien au régime gras notamment. Les procédures seront réalisées dans le respect du bien-être animal, sous anesthésie lorsque nécessaire pour limiter la souffrance, la douleur ou l'anxiété des animaux, et en respectant des points limites définis par le comportement des animaux, que ce soit leur comportement alimentaire, leur locomotion (position dans la colonne d'eau : nage en surface ou prostration au fond du bac) ou leur fonction respiratoire (mouvement operculaire). L'altération d'un ou plusieurs de ces paramètres conduira à une perte de poids significative qui lorsqu'elle sera supérieure à 20% conduira à l'arrêt du protocole expérimental (principe de raffinement).

15813 Dans l'Union Européenne, 127 millions d'individus sont atteints de stéatose hépatique (« maladie du foie gras »). Parmi eux, 25 millions ont une NASH (Non Alcoholic Steato-Hepatitis), qui peut évoluer vers la cirrhose et ses complications. La cirrhose est le stade final des maladies chroniques du foie. Elle est caractérisée par la présence de nodules entourés de denses cloisons fibreuses. La cirrhose mène à la dysfonction des organes et est responsable de 170 000 décès par an en Europe. Les causes de décès des malades atteints de stéatose hépatique peuvent être liées au foie, mais sont plus souvent encore d'origine cardio-vasculaire. Des données épidémiologiques suggèrent que la stéatose pourrait, en soi, favoriser les atteintes cardiovasculaires, notamment l'occurrence et les conséquences néfastes d'un infarctus du myocarde. Mais ces résultats sont indirects et aucune démonstration formelle n'a pour l'instant été faite d'un rôle causal de la maladie du foie sur les répercussions d'un infarctus du myocarde. Pourtant, élucider ce lien entre stéatose et infarctus du myocarde pourrait permettre de mettre en lumière des pistes thérapeutiques nouvelles et originales pour le traitement des maladies cardio-vasculaires chez ce type de patients. Dans ce projet, nous analyserons l'effet de l'atteinte hépatique sur l'aggravation de la dysfonction cardiaque en réponse à un infarctus du myocarde. Ce projet comporte 6 procédures qui impliqueront 1000 souris au total sur une durée de 5 ans. Les interactions entre le foie et le cœur sont des phénomènes complexes que des modèles *in vitro* ne peuvent absolument pas recréer. Seuls ces modèles, *in vivo*, nous permettront de comprendre l'impact d'atteinte hépatique sur le remodelage et la réparation tissulaire consécutifs à une affection cardiaque. Pour induire la NASH nous utiliserons soit des régimes alimentaires spécifiques soit des souris génétiquement modifiées. Ces animaux subiront également un infarctus du myocarde. L'analyse consistera alors à étudier la fonction cardiaque, le remodelage cardiaque et la réponse inflammatoire. Pour respecter le principe des 3R, nous utiliserons des méthodes alternatives *in vitro* lorsqu'il sera possible de les appliquer. Le nombre d'animaux utilisé sera réduit par l'utilisation de tests statistiques déterminant la taille minimale des groupes expérimentaux. Enfin, la souffrance animale sera réduite au maximum par le raffinement des méthodes expérimentales notamment l'utilisation d'anesthésie et d'analgésie adaptée durant les procédures, et l'établissement de points limites adéquats.

A terme, les résultats de ce projet permettront de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les effets néfastes de la maladie hépatique sur la fonction cardiaque après un infarctus du myocarde et pourraient, de fait, permettre le développement de nouvelles approches thérapeutiques chez les patients.

15814 Les syndromes myélodysplasiques (SMD) sont des maladies touchant la moelle osseuse et responsables d'un manque de cellules du sang. Le manque de globules rouges (anémie) représente la complication majeure des SMD. L'enjeu de la prise en charge des SMD est de diminuer le nombre de transfusions sanguines pourvoyeuses de complications liées à la surcharge en fer. De nouvelles molécules bloquant la mort des cellules de la moelle osseuse sont en cours de développement. Le Luspatercept (RAP-536) est une de ces nouvelles molécules et a déjà montré un effet positif sur la fabrication des globules rouges. Actuellement, il n'existe pas de modèle mathématique ou informatique pouvant prédire la réponse des SMD au Luspatercept justifiant le recours à un modèle animal. Dans ce projet, nous allons injecter dans le tibia de la souris les cellules responsables de la fabrication de toutes les cellules du sang associées à une injection de cellules souches mésenchymateuses (cellules qui tapissent les logettes osseuses où sont fabriquées les cellules du sang et qui vont recréer un environnement favorable pour la greffe) provenant du même patient atteint d'un SMD pour créer une souris humanisée mimant la pathologie humaine. Nous avons déjà mis au point dans le laboratoire, ce modèle de souris humanisées. Les souris seront réparties en 2 groupes : 1 recevra le RAP-536 et l'autre non. L'ensemble de ces procédures pouvant s'accompagner d'une douleur/angoisse modérée, tous les efforts seront entrepris pour réduire au minimum toute douleur, souffrance ou angoisse ressentie par les animaux. C'est pourquoi nous surveillerons l'état de santé des animaux tout au long des expériences afin de pouvoir intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de douleur, de souffrance ou d'angoisse. De plus, le nombre d'animaux nécessaire à cette étude a été réduit au minimum, sur la base des besoins imposés par les tests statistiques que nous utiliserons. De fait, un nombre total de 67 souris sera nécessaire, réparties en 2 groupes de 7 et 20 souris pour les greffes primaires puis 40 souris pour les greffes secondaires dont l'utilisation sera dépendante des résultats des prises de greffe primaires. Cette étude nous permettra de valider notre modèle de xénogreffe et de tester un nouvel agent thérapeutique innovant.

15815 La morphine est utilisée pour soulager les douleurs. Cependant, chez les rongeurs, les mâles et les femelles présentent une différence de réponse à cet analgésique. En effet, les femelles nécessitent environ 30% de morphine en plus en comparaison des mâles. De plus, un traitement chronique à la morphine provoque une tolérance à l'analgésie qui apparaît plus vite chez les femelles. Il y a alors une diminution des effets de la morphine qui entraîne la nécessité d'augmenter les doses afin d'obtenir un effet analgésique équivalent. Une fois administrée, la morphine est dégradée en morphine-3-glucuronide (M3G) qui est une molécule décrite pour provoquer une hyperalgésie (amplification de la douleur causée par une stimulation). Nos travaux ont récemment démontré que les quantités de M3G retrouvés en périphérie et dans le cerveau des souris femelles étaient supérieures à celle retrouvés chez les mâles suite à une administration de morphine périphérique. La nécessité d'administrer plus de morphine chez les femelles pour avoir une analgésie équivalente aux mâles pourrait être due à (i) une métabolisation plus importante de la morphine chez les femelles et/ou (ii) à une production accrue de M3G pro-algique, mais également à (iii) une différence de réponse à la M3G.

Ce projet vise à déterminer s'il existe une différence de réponse à la M3G qui est sexe-spécifique. Lors de ce projet des souris mâles et femelles recevront une injection unique périphérique ou centrale de M3G. Des dosages de la M3G dans le cerveau suivant une administration unique de M3G en périphérie nous permettront de comprendre l'apport du métabolisme central dans les différences d'analgésie entre les mâles et les femelles. Dans un deuxième temps, nous étudierons les différences de réponse à la M3G en utilisant un test de nociception basé sur le réflexe de retrait de la queue. La mise en évidence d'une différence de réponse permettrait de comprendre pourquoi il existe une différence sexe-spécifique dans la sensibilité à la morphine.

Adéquation avec la règle des 3R.

Remplacer Les modèles de culture cellulaire se heurtent à une transposition dans des modèles intégrés, la notion de nociception et de douleur étant uniquement visible et détectable chez l'animal par un test de comportement spécifique. C'est pour cette raison qu'une approche *in vivo* sur des souris est nécessaire.

Réduire Un total de 108 souris C57BL6/J mâles et 108 femelles est nécessaire à la réalisation des études statistiques (total de 216 animaux).

Raffiner Les animaux sont placés en cage par groupe de 5 individus. Ils seront maintenus dans un environnement enrichi selon les procédures en vigueur à l'animalerie (barre de bois à ronger, nid) qui permet un bien-être optimal des animaux (procédures en vigueur à l'animalerie). L'eau et la nourriture seront disponibles ad libitum. Les souris seront placées en cycle jour/nuit 12h/12h en condition de température et d'hygrométrie contrôlées. Il n'est attendu aucun stress ni aucune douleur prolongée chez les animaux. Nous avons établi des points-limite prédictifs permettant de soustraire l'animal à la souffrance.

15816 Fumer conduit à un vieillissement prématuré. La perte d'élasticité tissulaire et l'accumulation de cellules sénescentes sont des mécanismes connus pour accélérer le vieillissement lié à la fumée de cigarette. L'intoxication à la fumée de cigarette est également un facteur bien établi de risque de l'emphysème pulmonaire et de la bronchopneumopathie chronique obstructive (ou BPCO), quatrième cause de mortalité mondiale. La déstructuration des fibres d'élastine pulmonaire (perte d'élasticité) et la sénescence accrue des cellules pulmonaires (bloquant leur capacité de réparation et responsable d'une sécrétion aberrante de facteurs toxiques) sont également deux processus clés de l'emphysème et de la BPCO. L'utilisation d'un modèle de souris transgénique invalidé a déjà permis de comprendre l'importance de l'élastine dans plusieurs pathologies cardiaques chez l'homme, tel que le syndrome de Williams-Beuren, la sténose aortique supra-valvulaire et l'hypertension artérielle pathologies pour lesquelles la perte d'expression partielle de cette protéine est associée. Nos projets visent à approfondir la compréhension des mécanismes pathologiques et cancéreux qui sont associés à une perte d'élasticité cellulaire lors d'exposition à la fumée de cigarette et qui pourraient impliquer des mutations de l'élastine. Nous avons besoin pour cela de maintenir une lignée de souris transgénique invalide pour le gène de l'élastine. Notre demande vise à assurer la maintenance de notre modèle d'étude, cette procédure consiste à mettre en accouplement des souris mâles porteuses de la mutation d'intérêt de l'élastine avec des souris femelles ne présentant pas de mutations pour l'élastine. Cela nous permettra d'assurer le maintien des modifications génétiques sur lesquelles nous travaillons mais également de générer des cohortes d'étude afin de collecter des échantillons biologiques post-mortem et de préparer des groupes d'analyses pour des projets complémentaires de collaborateurs. Afin de nous conformer à la règle des 3Rs (Remplacement, Réduction et Raffinement), le nombre de souris nécessaire à la maintenance de notre modèle murin d'intérêt sera réduit au maximum sans compromettre le maintien de cette lignée sous forme respirant. Ce modèle sera cryopréservé dès que son utilisation scientifique ne sera plus nécessaire à nos projets. Toutes les souris porteuses de mutations pouvant les conduire à développer des traits pathologiques (hypertension artérielle et problèmes cardiaques) seront attentivement suivies afin d'identifier tout signe potentiel de mal-être ou de souffrance inutile. En raison de la nature complexe de ces recherches qui visent à comprendre les interactions cellulaires au sein de pathologies cardiovasculaires et respiratoires, et des différents organes affectés par sa dysfonction, nous ne pouvons malheureusement pas remplacer l'utilisation de modèles murins par des outils cellulaires ou des approches *in vitro*. Néanmoins, nous mettrons en place une surveillance adaptée et individuelle des animaux afin d'assurer que les souris en élevage ne subissent aucune souffrance. Ce suivi individuel permettra d'identifier l'apparition de signes évocateurs de souffrance des animaux étudiés (dyspnée, prostration, apathie) qui entrainerait alors une fin d'expérimentation immédiate. Dans leur ensemble, ces approches devraient réduire le nombre d'animaux utilisés et éviter toute souffrance inutile. Ce projet nécessitera l'utilisation d'un maximum de 150 souris sur une période de 5 ans afin d'assurer le maintien et la production de cohortes expérimentales soumises à d'autres demandes éthiques.

15817 Les thérapies anti-tumorales stimulant la réponse du système immunitaire contre la tumeur, les immunothérapies, révolutionnent le traitement des tumeurs solides. Bien que très efficaces chez certains patients, une grande majorité d'entre-eux n'obtient cependant pas de réponse thérapeutique avec ces nouveaux traitements. Cet échec s'explique en partie par un défaut

d'infiltration des lymphocytes à l'intérieur des tumeurs. En effet, la présence de lymphocytes dans les tumeurs est un pré-requis indispensable pour garantir l'efficacité des immunothérapies. Par conséquent, des stratégies thérapeutiques visant à augmenter le recrutement des lymphocytes dans les tumeurs pourraient permettre à un plus grand nombre de patients de bénéficier des immunothérapies.

Une façon d'augmenter le recrutement des lymphocytes est d'agir sur le réseau vasculaire de la tumeur. Les vaisseaux sanguins intra-tumoraux sont généralement associés à un mauvais pronostic car ils favorisent la croissance et la dissémination de la tumeur. Néanmoins, tous ces vaisseaux ne sont pas équivalents. En particulier, nous avons démontré que les vaisseaux high endothelial venule (HEV) sont associés à un bon pronostic clinique dans le cancer du sein et le mélanome chez l'Homme. Situés normalement dans les ganglions lymphatiques, ces vaisseaux sont spécialisés dans le recrutement des lymphocytes depuis la circulation sanguine. Ainsi, lorsqu'ils se développent dans les tumeurs, ils contribuent à l'élimination des cellules cancéreuses en favorisant l'entrée des lymphocytes anti-tumoraux.

Notre projet est de mettre au point une thérapie inédite visant à induire des vaisseaux HEV dans les tumeurs. Concrètement, ce projet consistera à tester des agents inducteurs de vaisseaux HEV déjà disponibles ou en cours de production au sein de l'équipe.

Ce projet nécessite l'utilisation de modèles animaux car l'étude des vaisseaux HEV par des méthodes alternatives *in vitro* est impossible pour le moment. Effectivement, les cellules endothéliales au phénotype HEV sont des cellules extrêmement plastiques et dépendantes de leur micro-environnement. Lorsqu'elles sont cultivées *ex vivo*, elles perdent très vite leur phénotype. De plus, aucune lignée cellulaire endothéliale disponible ne possède et ne peut acquérir le phénotype HEV. Enfin, les cellules HEV sont les constituants de vaisseaux spécialisés dans le recrutement des lymphocytes et l'évaluation de cette fonction biologique ne peut également être réalisée qu'*in vivo*.

Les modèles animaux pertinents qui ont été choisis, caractérisés et qui sont utilisés par notre équipe sont des modèles murins de tumeur induite par injection de lignées cellulaires cancéreuses. L'utilisation de la souris est également motivée par l'existence d'un nombre important d'animaux transgéniques, ce qui est critique pour analyser l'importance d'une population cellulaire ou d'une voie moléculaire sur les paramètres étudiés. A l'heure actuelle, seule l'espèce murine offre de tels avantages.

Pour la réalisation du projet avec ses différentes étapes, le nombre maximal de 1158 souris a été défini pour une période de 5 années.

Réduire Le projet est conçu avec une hiérarchie des procédures où la réalisation d'une procédure ultérieure est possible uniquement si les résultats de la précédente procédure le justifient (fonctionnement de type "go/no go"). Les lots d'animaux établis pour chaque procédure ont été définis à l'aide d'approches statistiques de façon à utiliser un nombre minimal d'animaux mais suffisant pour réaliser une analyse statistique des résultats obtenus, ce qui est indispensable pour l'interprétation finale des résultats.

Raffiner La stratégie de raffinement est premièrement fondée sur l'utilisation de points limites précoces, prédictifs et adaptés. Après chaque procédure, le suivi des animaux, réalisé par les expérimentateurs ou l'équipe de zootechnie, sera quotidien (aspect externe, comportement, surveillance tumeur). Si l'un des critères d'arrêt est atteint, les procédures seront immédiatement stoppées. Systématiquement, les procédures ont été optimisées afin de générer le moins de stress et de douleurs aux animaux. Ainsi, des anesthésiants et/ou des analgésiques sont utilisés lors des procédures réalisées. Les conditions d'hébergement et les méthodes expérimentales utilisées sont les plus appropriées pour réduire au maximum toute angoisse et dommages durables que pourraient subir les animaux. Enfin, les expérimentateurs disposent d'une forte expérience sur les modèles animaux et les procédures mentionnés dans ce projet, et presque l'intégralité de ces procédures ont déjà été réalisées dans le cadre de précédentes APAFIS.

Remplacer Aucun système de culture *in vitro* en deux ou trois dimensions ne permet à l'heure actuelle de cultiver des cellules endothéliales au phénotype HEV. De plus, les cellules HEV cultivées

ex vivo après isolation depuis des tissus perdent très rapidement leur phénotype. De ce fait, l'étude des cellules HEV et des vaisseaux qu'elles constituent n'est actuellement possible qu'*in vivo*. Cependant, dans l'objectif de limiter le recours au modèle animal, les agents thérapeutiques produits par l'équipe ne seront pas directement testés sur des animaux. Ces composés devront d'abord être validés par un test de bio-activité sur des modèles cellulaires afin de prouver qu'ils sont biologiquement fonctionnels. Enfin, il est important de noter que les recherches menées dans le cadre de ce projet apporteront de nouvelles connaissances moléculaires qui sont indispensables au développement de systèmes de culture de cellules HEV et qui permettront à l'avenir des études *in vitro* ne nécessitant pas l'utilisation d'animaux.

15818 Plus de la moitié des patients souffrant d'un cancer reçoivent un traitement par radiothérapie. Cependant certaines tumeurs cérébrales dont les glioblastomes récidivent dans les champs d'irradiation, principalement suite à une faible réponse de ces cellules tumorales à la radiothérapie. *In vitro*, nous avons identifié des protéines impliquées dans les mécanismes de radiorésistance de ces cellules et nous avons démontré que le blocage de voies biologiques permettait de rendre la radiothérapie plus efficace.

Chez le patient les cellules tumorales se développent dans un microenvironnement vascularisé, contenant d'autres types cellulaires, au contact duquel elles se modifient, s'adaptent, migrent. Il est donc indispensable de valider notre preuve de concept dans ce contexte plus global qu'il est impossible de reproduire *in vitro*. Nous envisageons d'utiliser un modèle de souris immunodéficientes dites souris " nude ". L'absence de système immunitaire chez ces animaux permet l'implantation de cellules humaines dans un modèle murin. De plus les cellules tumorales humaines provenant de glioblastomes seront implantées dans le cerveau des animaux (xénogreffes orthotopiques) afin de conserver leurs interactions avec le microenvironnement.

Après traitement par des inhibiteurs des voies biologiques préalablement identifiées *in vitro* puis irradiation focalisée sur la tumeur, nous nous attendons à observer une régression de la croissance tumorale et/ou un délai de survie augmenté chez les animaux traités par les inhibiteurs d'intérêt. Ces essais pré-cliniques conduiront, au sein de notre équipe spécialisée en recherche translationnelle, à la réalisation d'essais cliniques associant les rayons aux inhibiteurs des cibles validées *in vivo* chez des patients porteurs de glioblastome.

Les animaux sont hébergés dans des conditions qui répondent à la fois à la réglementation nationale et aux directives européennes dans le domaine de l'expérimentation et de l'éthique animale. Afin de réduire au maximum le stress des animaux, ils seront manipulés avec précautions et calme durant toute la durée de l'expérience par des personnes préalablement formées.

La règle des 3R sera appliquée dans le cadre de ce projet

1-Remplacement Le recours à l'expérimentation animale dans cette étude se fera après une étude approfondie des inhibiteurs *in vitro* sur les mêmes modèles cellulaires que ceux qui seront injectés aux animaux. Le principe de remplacement n'est pas applicable dans ce projet car l'interaction de la cellule avec son environnement influence la réponse biologique de la tumeur aux inhibiteurs et aux rayons et une étude *in vitro* seule ne permettrait pas l'obtention de résultats scientifiques exploitables pour une éventuelle application en thérapeutique humaine.

2-Réduction Sur la base de nos études antérieures et des données de la littérature, nous avons limité le nombre d'animaux à 5 ou 10 par groupe de traitement ceci étant le minimum requis pour avoir une significativité statistique (dûe à l'hétérogénéité de la prise tumorale, de la croissance des tumeurs chez les animaux et de la réponse aux inhibiteurs ou à l'irradiation). Dans une première partie nous adapterons la concentration de l'inhibiteur et la durée de traitement, pour cela nous limiterons à 4 concentrations maximum sur 3 durées différentes sur des groupes de 5 souris soit 60 souris par inhibiteur. Dans un deuxième temps nous étudierons l'association de la radiothérapie et de l'invalidation de la cible dans la tumeur. Pour cela quatre groupes de 10 souris seront nécessaires pour valider chacune des cibles préalablement identifiées *in vitro* groupe contrôle, groupe irradiation, groupe avec inhibition de la cible et groupe irradiation et inhibition de la

cible. Ceci concernera 40 animaux par cible. Nous envisageons de tester une dizaine d'inhibiteurs sur la durée du projet ce qui correspond à 1000 souris maximum (60+40 par inhibiteur).

3-Raffinement Le milieu environnemental et les conditions d'hébergement des souris seront améliorés, les cages seront agrémentées de boules de coton, de tubes en cartons, de tunnels ou « d'igloos » pour que les animaux aient une meilleure stimulation sociale et physique. Les animaux seront observés tous les 2 jours et seront euthanasiés dès l'apparition de signes neurologiques ou de souffrance (prostration, difficulté de mouvement, amaigrissement, dos vouté) qui définissent les points limites de nos expérimentations. Cas particulier de la chirurgie les souris seront observées quotidiennement pendant 3 jours pour vérifier la récupération post-chirurgicale. En cas de signes de douleur dans les jours qui suivent la chirurgie (isolement, yeux fermés, dos vouté, immobilité, perte de poids, déshydratation, yeux et abdomen creux, automutilation etc), ajout de kétoprofène (AINS) à 5mg/kg en intramusculaire 1x/jour jusqu'à disparition des signes (Volume d'injection 5µl/g de souris). Toutes les manipulations qui pourront être stressantes ou douloureuses pour l'animal seront réalisées après anesthésie (implantation des tumeurs, irradiation des animaux, IRM). Toutes les personnes effectuant des gestes techniques sur les animaux seront formées.

Ce projet a d'ores-et-déjà été appuyé par différents comités scientifiques nationaux (Plan Cancer, ARC et RITC notamment).

15819 Le but de ce projet est de former le personnel aux gestes techniques d'administration intra-trachéale ou intra-nasale ou de prélèvement sanguin en rétro-orbital sous anesthésie générale afin de minimiser les situations douloureuses et stressantes.

La formation est nécessaire pour acquérir un geste efficace et contrôlé en respectant les techniques de manipulations des rongeurs

Les conditions d'hébergement sont celles requises par l'annexe II de l'arrêté relatif à l'agrément des EU. Les animaux seront mis à mort selon la réglementation en vigueur.

Le projet pourra comporter jusqu'à 600 animaux au total sur la période de 5 ans.

La formation sera effectuée sur des souris de souches C57BL/6 (B6) et sur des souris issues des surplus d'élevage de notre établissement utilisatrices destinées à être mises à mort. Ces souris pourront être génétiquement modifiées sans phénotype dommageable.

A ce jour, l'animal de laboratoire reste le seul recours fiable et pertinent permettant de former aux gestes techniques fins comme l'administration intra-trachéale ou intra-nasale ou le prélèvement sanguin en rétro-orbital. Ce projet sera réalisé en respectant les principes fondamentaux de l'expérimentation animale

Remplacement le modèle animal est fondamental dans notre cas, puisque la formation du geste technique ne peut se faire que sur un organisme vivant entier.

Raffinement les animaux sont observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être et suivis pendant et après l'expérimentation afin d'éviter au maximum la douleur et le stress au moment de l'expérimentation.

Réduction le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum nécessaire. Les animaux utilisés seront issus du surplus de production.

Les dommages attendus pour l'animal sont limités, tous les gestes se faisant sous anesthésie générale et les animaux étant suivis individuellement pendant leur phase de réveil et jusqu'à leur mise à mort. Le suivi des animaux pendant et après l'expérimentation sera effectué suivant des critères définis dans une grille de score clinique.

15820 Des troubles neurocognitifs affectent fortement la qualité de vie de nombreux patients traités pour un cancer. La radiothérapie de tumeurs cérébrales est à l'origine de troubles cognitifs sévères chez 50 à 90% des patients dans les 3 à 6 mois après traitement. Ces effets tardifs sont causés en partie par une atteinte des cellules souches neurales à l'origine de la production de neurones (neurogenèse) et une perte importante de cellules qui protègent les neurones et constituent la myéline.

Notre projet a pour objectif d'établir des conditions optimales pour stimuler la neurogenèse et/ou la formation de myéline. Il s'agit pour cela de cibler une population abondante de neuroblastes immatures, présente dans le cerveau. Ces cellules ont en effet la particularité *in vitro* d'acquérir des propriétés de cellules souches neurales et peuvent être programmées pour différentes fonctions.

Nous avons montré par ailleurs que de nombreux mécanismes modifiant de façon réversible l'expression de gènes se produisent lors de la neurogenèse en particulier au stade neuroblaste. Dès lors, la reprogrammation des neuroblastes pour la production de neurones ou de cellules de myéline, notamment à l'aide de petites séquences d'ARN non codant (microARNs), pourrait représenter une nouvelle stratégie thérapeutique dans différentes pathologies du système nerveux. En effet, elle permettrait de stimuler la régénération tissulaire à partir des propres cellules du patient.

Les protocoles mis en jeu ici requièrent des modèles animaux précliniques. En effet, aucune méthode alternative (modèle *in vitro* ou simulation informatique) n'existe à ce jour pour modéliser la complexité du cerveau et le microenvironnement des cellules souches neurales. L'espèce retenue pour ce projet est la souris dont la neurogenèse présente de nombreuses similarités avec celle de l'ensemble des mammifères et offre un nombre très important d'outils moléculaires.

Nous utiliserons principalement deux procédures de lésions cérébrales 1/ par irradiation du cerveau ou 2/ par induction chimique d'altération de la myéline afin de mettre en évidence le potentiel régénératif des neuroblastes immatures dans ces deux contextes pathologiques. Ces interventions seront pratiquées sous anesthésie générale. Le modèle de souris transgéniques qui sera utilisé exprime une protéine fluorescente spécifiquement dans les neuroblastes immatures. Nous utiliserons pour cela des cellules de neuroblastes immatures dont le patrimoine génétique aura été modifié *in vitro* préalablement à l'aide de petites séquences d'ARN mimant ou inhibant les microARNs d'intérêt de façon à favoriser une reprise la neurogenèse et/ou stimuler la formation de la myéline.

Le nombre d'animaux (1194 pour 5 ans) a été réduit au minimum nécessaire pour ne pas compromettre la validité des expériences. Les souris hébergées en groupe, seront maintenues dans un environnement enrichi (coton de nidification, tunnel en carton). Toutes les interventions chirurgicales sont réalisées sous anesthésie générale et administration d'un antalgique en pré- et post-opératoire. L'application de critères d'arrêts définis nous permettra d'intervenir immédiatement dès le moindre signe de souffrance en utilisant des traitements antalgiques appropriés ou de décider d'une euthanasie.

15821 Un nouveau domaine de l'oncologie vise à mieux appréhender certains effets secondaires induits par le cancer et ses traitements, concernant plus spécifiquement la fatigue et la survenue de troubles cognitifs, souvent rapportés par les patients. En effet, les patients atteints de cancer présentent, pendant et après un traitement de type chimiothérapie, des déficits cognitifs que l'on regroupe sous le terme de « Chemofog ». Il a notamment été montré par imagerie par résonance magnétique fonctionnelle, une activation plus étendue des circuits neuronaux impliqués dans le processus de mémoire de travail suggérant une atteinte de certaines régions cérébrales, de quelques mois à quelques années après l'arrêt d'un traitement par chimiothérapie. De plus, des altérations histologiques telles qu'une diminution de la substance grise et blanche dans le cortex préfrontal et le gyrus parahippocampal ont été observés chez des patients après l'arrêt du traitement. Les études portant sur l'impact cérébral des thérapies du cancer dans des modèles animaux sont essentielles pour comprendre les mécanismes et mais aussi prévenir ces effets indésirables, afin d'améliorer la qualité de vie des patients. Depuis plusieurs années, des travaux portant sur des extraits de Ginseng ont permis de mettre en évidence des effets stimulateurs et inhibiteurs associés à la neurotransmission, une amélioration de la mémoire et l'apprentissage, impliquant aussi l'amélioration des symptômes liés à la fatigue. D'autres compléments alimentaires ont montré leur bénéfice dans une étude multicentrique portant sur des patients cancéreux en cours de traitement ou après traitement par chimiothérapie, avec une diminution significative de la fatigue. Des travaux menés dans des modèles animaux de rongeurs montrent aussi des effets bénéfiques anti-oxydatifs de la vitamine C sur les organes périphériques, en diminuant les cytotoxicités et les dommages à l'ADN induits sur les tissus sains par la chimiothérapie. Dans ce contexte, nous

proposons de développer un modèle animal pour évaluer les potentiels effets bénéfiques d'un complément alimentaire (Comp.AI) et/ou de la Vitamine C sur les effets de la chimiothérapie, sur le plan comportemental et neurologique. Leurs effets seront étudiés sur certaines fonctions cognitives, la réactivité émotionnelle (anxiété/dépression) ainsi que sur des fonctions liées au rythme veille/sommeil, l'attention et la motivation, dont une altération pourrait être associée à la baisse d'activité (associé à un syndrome de fatigue) rencontrée chez les animaux traités par une chimiothérapie de type 5-fluorouracile (5-FU). Les cerveaux et plasmas seront prélevés pour comprendre les modifications neurobiologiques, et pour analyser les niveaux de cytokines, de corticostérone, et de dérivés métaboliques du Comp.AI après digestion, respectivement.

Pour cela, les souris recevront une injection hebdomadaire de 5-FU combinée à une administration quotidienne de Comp.AI+vitamine C, vitamine C ou Placebo, 5 jours par semaine durant 3 semaines suivant la première injection de chimiothérapie. Différents tests comportementaux seront réalisés afin d'évaluer les effets de la chimiothérapie et des traitements adjuvants (Comp.AI et vitamine C) sur les comportements de type anxieux, dépressifs, les performances d'apprentissage spatial, de mémoire spatiale, de flexibilité comportementale, l'attention et la motivation. Ces tests se dérouleront sur plusieurs semaines, avec un test par jour. Les animaux seront habitués à la pièce d'expérimentation avant le début du test. A l'issue de chaque test, les animaux seront replacés dans leur cage d'hébergement avec leurs congénères. Au cours de la dernière semaine d'expérimentation, les souris recevront des injections d'un agent intercalant afin de visualiser les cellules en prolifération dans le cerveau grâce à des marquages qui seront réalisés ultérieurement sur des coupes de cerveaux. Un total de 450 souris sera utilisé, soit 6 groupes de 15 animaux pour traiter les aspects émotionnels et cognitifs, 6 groupes de 15 animaux pour évaluer le cycle nyctéméral, 6 groupes de 15 animaux pour mesurer l'attention, 6 groupes de 15 animaux pour déterminer la motivation, et enfin 90 animaux pour l'évaluation des taux de cytokines et des dérivés de Comp.AI administrés.

Durant toute la durée de l'expérimentation, la règle des 3R sera respectée. Ce projet implique l'utilisation de tests comportementaux pour évaluer notamment les émotions, l'apprentissage, la mémoire ainsi que des études neurobiologiques et nécessite donc l'utilisation d'animaux. Les souris seront habituées aux conditions d'hébergement pendant les 2 semaines qui suivent leur livraison. Elles seront hébergées en groupe dans des cages de taille réglementaire, avec un enrichissement du milieu leur permettant de faire des nids. La température et l'hygrométrie des pièces d'hébergement et d'expérimentation sont contrôlées. Au cours de cette période, les animaux seront progressivement familiarisés à la manipulation par l'expérimentateur. Un suivi quotidien des animaux sera réalisé notamment au moment de la pesée/administration des traitements et permettra de déceler un éventuel signe de souffrance. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, les mêmes souris seront utilisées pour plusieurs évaluations comportementales. A la fin des expérimentations, ces animaux seront mis à mort de manière réglementaire après anesthésie et leurs organes seront prélevés afin de réaliser des études biologiques permettant de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les éventuels troubles comportementaux mis en évidence.

15822 En décembre 2019, un nouveau coronavirus, le SARS-CoV-2, a été identifié à Wuhan, en Chine, suite à une épidémie de syndrome respiratoire aigu. Au 18 mai 2020, plus de 4700000 cas ont été signalés dans le monde avec près de 315000 décès. La maladie se caractérise par une série de symptômes bénins dans la plupart des cas mais peut mener à une détresse respiratoire aiguë dans les cas sévères. Il n'existe pas de traitement efficace et spécifique pour cette maladie. A ce jour, seuls des soins de soutien (apport en oxygène, hydratation) sont utilisés. Les recherches actuelles s'accroissent afin de trouver un vaccin et des traitements antiviraux pour lutter contre les épidémies futures qui devront être testés dans un modèle animal validé, incluant aussi les modifications du microbiote hébergé par l'animal. La souris n'exprime pas naturellement la cible moléculaire du virus (ACE2) et doit donc être génétiquement modifiée, cependant l'accès à ce type de souris est encore difficile et leur système immunitaire reste très différent de l'Homme. D'autres espèces montrent une susceptibilité naturelle au virus comme le hamster, mais leur système immunitaire et pulmonaire

différent de l'humain ne les rend pas appropriées. Les modèles animaux de maladies infectieuses, doivent récapituler certaines conditions pour être pertinents présenter une analogie entre les symptômes de la maladie humaine et ceux observés chez l'animal modèle présenter des mécanismes physiopathologiques similaires à l'Homme et présenter une sensibilité à des traitements connus pour être efficace chez les patients. Dernièrement, la proximité phylogénétique des singes avec l'homme ont fait de ces espèces un atout dans la lutte et la recherche sur les coronavirus en général. Cependant, toutes les espèces de singes ne sont pas égales devant les maladies différence de réplication virale pulmonaire après infection et tableau clinique différent. Parmi les efforts engagés dans la lutte contre l'épidémie causée par SARS-CoV2, les deux principales espèces de singes utilisées pour l'instant sont les macaques rhésus, le cynomolgus et très récemment le grivet. Le macaque rhésus semble être le meilleur modèle pour reproduire la forme clinique modérée mais l'accès à cette espèce est actuellement difficile en Europe. Au-delà de ces deux travaux, le développement de nouvelles thérapies contre SARS-CoV-2 a récemment engendré un besoin dramatique de modèles précliniques pertinents.

Dans le présent projet, un modèle primate d'infection par SARS-CoV2 sera développé chez le singe grivet et des méthodes analytiques innovatrices consistant à suivre l'évolution du microbiote pulmonaire et rectal et l'expression génétique en réponse à l'infection seront utilisées. Les données apporteront une contribution différente et supplémentaires aux résultats scientifiques déjà obtenus. Les deux procédures décrites utiliseront un isolat du virus français, alors que l'unique travail scientifique existant sur le même virus utilisait une souche distincte. Afin de valider le singe grivet comme modèle préclinique et garantir la comparabilité des résultats, il est important de vérifier que divers isolats du virus produisent les mêmes résultats en termes de charge virale et de symptômes.

Dans une première procédure, le grivet sera utilisé pour caractériser l'infection administrée par voie intranasale et intratrachéale chez 3 animaux mâles et 3 animaux femelles. Un animal contrôle sera également suivi dans les mêmes conditions (prélèvements et injection d'une solution dénuée de substances virales). Le suivi des animaux infectés sera effectué régulièrement par des prélèvements d'échantillons provenant des voies aériennes supérieures et inférieures (écouvillons, lavages broncho-alvéolaires), de matières fécales et de sang donnant de nouvelles informations sur le microbiote pulmonaire et rectal, la réponse immunitaire et l'expression génétique. Une partie des animaux (1 mâle, 1 femelle et 1 animal contrôle) sera mis à mort au pic théorique de l'infection afin d'identifier de possibles lésions histologiques. La mise à mort de l'animal contrôle est requise pour suivre les lésions histopathologiques entraînées lors des différentes interventions au niveau des muqueuses (écouvillonnages et lavages bronchoalvéolaires) et pouvant constituer des biais vis-à-vis des réelles lésions causées par l'infection. Les 4 animaux restants seront suivis durant 3 semaines.

La deuxième procédure impliquera une infection comme dans la première procédure, suivi d'une administration d'une thérapie anti-SARS-CoV-2. Le suivi sera similaire mais allégé et raffiné en fonction des résultats de la première étude (dynamique de la virémie, présence ou non de lésion histologiques...). Les analyses permettront de voir la réponse de l'animal à la thérapie suite à l'infection (suivi de la charge virale, l'évolution du microbiote pulmonaire et rectal, la réponse immunitaire de l'animal et l'expression génétique).

Remplacement Pour valider l'efficacité de nouvelles thérapies, il est nécessaire d'avoir dans un modèle proche de l'Homme, en plus de modèles *in vitro*. Les modèles animaux sont essentiels pour comprendre la pathogénèse des virus et pour évaluer des nouvelles thérapies. Les modèles de singes, sont considérés comme des modèles de référence pour le développement de thérapies anti-infectieuses proximité physiologique et immunitaire avec l'homme et d'anatomie des voies respiratoires (posture verticale par opposition aux modèles rongeurs ou porcins) permettant de tester fidèlement l'efficacité des thérapies anti-infectieuses.

Raffinement Les 6 animaux qui seront infectés seront hébergés ensemble au sein d'un même hébergement. L'animal contrôle sera hébergé avec d'autres congénères. Tous les animaux seront suivis quotidiennement, afin de détecter tout signe clinique anormal, de douleur et/ou détresse observation biquotidienne, évaluation du stress et douleur quotidienne, pesée fréquente, suivi de la température par sonde autonome implantée et suivi renforcé pendant la période critique après

l'infection. Les animaux seront anesthésiés ou sédatisés pour certains prélèvements pouvant entraîner une gêne (lavages alvéolaires). Des mesures préventives et correctives sont également définies en fonction de l'apparition de signe de stress ou de douleur. Des points limites sont définis pour sortir l'animal de l'étude si des effets attendus ou inattendus apparaissent. Dans ce cas, le vétérinaire sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés. Les manipulations des animaux seront réalisées exclusivement par du personnel formé et compétent.

Réduction Il est prévu d'utiliser 60 singes (mâles et/ou femelles) par an, soit 300 animaux sur 5 ans. Au vu de l'ampleur de l'épidémie et les demandes conséquentes de tests de thérapies antivirales contre le SARS-CoV-2, ce nombre semble nécessaire pour pouvoir y répondre. Ce nombre total pourrait être réduit car la procédure 1 ne sera réitérée que dans le cas où la souche virale est différente. De plus, si les différentes demandes ne se concrétisent pas, le nombre pourra de facto être réduit. Ce nombre a été réduit au minimum pour obtenir des résultats interprétables et transposables à l'Homme. Les animaux utilisés proviendront d'un élevage agréé et l'ensemble du projet sera mené en accord avec la réglementation européenne et nationale.

15823 La polykystose rénale autosomique dominante (PKRAD) est une maladie génétique affectant une personne sur 500. Cette affection est responsable de 10% des cas « d'insuffisance rénale terminale » qui nécessitent le recours à la dialyse ou à la transplantation rénale, deux procédures lourdes et coûteuses. La PKRAD est caractérisée par le développement progressif de multiples kystes dans les reins entraînant la destruction progressive du tissu rénal. Actuellement aucun traitement ne permet de bloquer la formation des kystes. Il s'agit d'un mécanisme complexe faisant intervenir différents types cellulaires ainsi qu'un remodelage de l'architecture rénale qui ne peut être reproduit *in vitro*. Il est donc nécessaire d'avoir recours à des modèles animaux principalement murins car la souris est le seul animal pour lequel nous disposons actuellement de modèle de PKRAD impliquant les mêmes gènes que la pathologie humaine.

On ne connaît pas actuellement les mécanismes à l'origine de la formation des kystes mais on sait que le cil primaire est indispensable à ce processus.

Le cil est une extension microscopique de la cellule. Il peut être mobile (ou motile) tel le flagelle du spermatozoïde ou immobile, on l'appelle alors cil primaire. Dans le rein, le cil primaire, situé à la surface des cellules rénales capte des signaux mécaniques et chimiques induits par le flux urinaire et les transmet à la cellule. L'ablation du cil primaire permet de prévenir la formation des kystes rénaux chez les souris présentant une polykystose rénale, cependant les mécanismes contrôlés par le cil à l'origine de la formation des kystes ne sont pas connus.

La formation des kystes est un processus habituellement très progressif mais il a été montré récemment, que l'interruption du flux urinaire induit par une obstruction de l'arbre urinaire entraîne le développement de kystes rénaux en moins de 4 jours dans un modèle murin.

La rapidité de développement des kystes observée dans ce modèle permet pour la première fois d'envisager l'étude des mécanismes initiant leur formation.

L'étude proposée ici a pour but de comprendre les processus de la formation des kystes afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques susceptibles d'empêcher le développement de la maladie chez les patients.

Le nombre maximum d'animaux utilisés pour cette recherche est de 406 souris sur 3 ans.

L'ensemble de ce projet fera appel à 3 procédures l'induction d'une polykystose rénale dans des souris génétiquement modifiées pour identifier le rôle du cil primaire dans la kystogénèse une obstruction urinaire et une observation par méthode d'imagerie, dite « intra-vitale », permettant de visualiser directement les modifications de l'architecture du rein.

Pour réduire le nombre d'animaux, nous avons estimé la taille des échantillons permettant une analyse statistique efficace. Afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligées aux souris, la chirurgie et l'imagerie intravitale seront réalisées sous anesthésie générale, surveillée régulièrement afin de garantir une sédation optimale, et des antalgiques sont prévus en post-opératoire. Des études antérieures ont permis de montrer que, sur la période étudiée (moins de 4 jours) les souris ne présentaient pas de perte de poids ni de signes suggérant une souffrance. Des

points-limites ont par ailleurs été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire. L'analyse des mécanismes à l'origine des modifications de comportement des cellules rénales observées au cours de cette étude se fera à l'aide de modèles *in vitro* afin de limiter le recours à l'expérimentation animale.

En permettant de mieux comprendre le lien existant entre cil primaire et formation des kystes, ce projet devrait déboucher sur de nouvelles approches thérapeutiques dédiées aux patients atteints de polykystose rénale.

15824 L'évolution des soins parentaux est un axe majeur de la recherche écologie évolutive. Les amphibiens fournissent de nombreux exemples de comportements parentaux. Le crapaud accoucheur présente un mode de reproduction spécifique avec une ponte hors du milieu aquatique et un transport des œufs sur le dos du mâle pendant le premier tiers du développement embryonnaire. Le mâle va ensuite déposer les œufs à l'eau et les têtards vont finir leur développement en milieu aquatique. La période reproduction s'étale de mars à juillet et le développement est donc exposé à des températures contrastées. Ce modèle est très pertinent pour étudier les bénéfices des soins parentaux aux stades précoces.

L'objectif principal du projet est de mesurer l'influence de la température sur les trajectoires de développement embryonnaire. Nous voulons étudier l'importance relatives des conditions thermique 1) en phase d'incubation (stade œuf) et 2) en phase aquatique (stade têtard). Les mâles adultes avec ponte seront capturés sur le terrain et maintenus de façon transitoire en captivité (le temps de l'incubation soit 2-4 semaines). Ils seront maintenus dans trois conditions thermiques différentes (16/20/24°C) dans le cadre de la procédure 1. Une fraction des têtards issus de ces mâles sera conservée. Les autres seront relâchés sur les terrains. Les têtards maintenus en captivité seront placés dans trois conditions thermiques différentes (16/20/24°C) dans le cadre de la procédure 2. Après la métamorphose les jeunes seront maintenus dans des conditions standards et suivis (procédure 3) afin de clarifier les effets des conditions thermiques de développement. Après 4 mois, ils seront relâchés au lieu exact de capture.

L'effectif prévu est de 45 mâles reproducteurs (15 mâles par traitement d'incubation). Chaque mâle produira une cinquantaine de têtards (soit 2250 têtards en tout) ce qui correspond à un effectif total maximum de 2295 individus. Après l'éclosion des œufs, 9 têtards seront conservés par mâle et repartis en trois traitement (soit 405 têtards issus de 45 pères).

La règle des trois R a été prise en compte de la façon suivante

- Remplacement l'étude concerne spécifiquement le mode de reproduction de cette espèce en conditions naturelles. Il n'est pas possible de remplacer les crapauds vivants par d'autres processus ni par des individus captifs.

- Réduction Le nombre de captures sera réduit au minimum (15 mâles par traitement) pour permettre de détecter des différences significatives en prenant en compte les origines paternelles. Les mâles seront marqués afin d'éviter toute seconde utilisation. Seule une fraction des têtards sera maintenue en captivité

- Raffinement la durée des manipulations sera réduite au minimum. Les conditions d'hébergement seront optimisées (nombreux abris et dérangement minimum). Nous nous appuierons sur un suivi journalier des individus avec plusieurs paramètres considérés (masse, comportement). En cas d'apparition de comportements anormaux ou d'une perte de masse importante les individus seront sortis de l'étude, remis en conditions d'élevage standard et examinés par le vétérinaire référent.

15825 Dans les cellules de mammifères, l'ADN, support de l'information génétique au sein du noyau, est présent sous une forme structurée, la chromatine. C'est la chromatine, et non l'ADN seul, qui est impliquée dans tous les événements moléculaires faisant intervenir le matériel génétique, à savoir la réplication, la transcription, la réparation et la recombinaison. L'organisation de l'ADN en chromatine est donc essentielle et doit être préservée tout particulièrement au cours des divisions cellulaires. Essayer de comprendre la nature et la dynamique de cette organisation a amené à caractériser des facteurs essentiels à sa formation et à son maintien. Les premières "briques" de

cette architecture particulière sont des petites protéines compactrices, les histones. Elles forment un cœur protéique autour duquel la molécule d'ADN s'enroule. Ce motif se répète pour former une structure qui ressemble à un collier de perles, la chromatine. Lors de chaque division cellulaire, la cellule fabrique une grande quantité d'histones pour reproduire la chromatine. Une question primordiale est de savoir comment ces histones sont choisies et prises en charge après leur production pour être escortées et délivrées au bon endroit, au bon moment pour construire une architecture spécifique et la reproduire. Des protéines spécialisées, appelées chaperons d'histones, protègent, surveillent et accompagnent les histones tout au long de leur vie. Un des rôles les mieux connus des chaperons d'histones est leur fonction dans l'assemblage de la chromatine.

Notre projet a pour objectif d'évaluer comment les réseaux des chaperons d'histones s'adaptent aux changements physiologique et développemental, entre plasticité et stabilité afin de maintenir l'intégrité de la chromatine. Nous allons étudier l'impact de ces changements à l'échelle d'un organisme vivant entier, la souris, afin de mieux comprendre le rôle des chaperons d'histones dans un contexte physiologique. Nous avons récemment généré des souris génétiquement modifiées pour certains chaperons d'histones, afin de comprendre l'importance de ces protéines dans un organisme vivant, dans un tissu donné et à un stade développemental spécifique.

Toutes les souris génétiquement modifiées utilisées dans ce projet ne présentent pas de phénotype dommageable ni pendant le développement embryonnaire ni à l'âge adulte.

Les interventions sur souris se limitent à des injections intrapéritonéales non douloureuses pour engager la perte des chaperons d'histones concernés. Suite à cette perte, des analyses permettront de définir la fonction/rôle de ces protéines dans un organisme entier, menant à l'analyse d'environ 180 souris pour les 5 ans du projet.

Ce projet est en accord avec la règle des 3R

- Remplacer toutes les études pour comprendre la fonction des chaperons d'histones ont été basées sur des modèles *in vitro* ou cellulaires. L'étape suivante nécessite des expériences *in vivo* pour évaluer la pertinence physiologique de nos découvertes à l'échelle d'un organisme entier, ce qui ne peut pas être obtenu par des méthodes alternatives. La souris a été choisie pour son génome bien caractérisé et sa capacité à générer des souris génétiquement modifiées.

- Réduire : Pour minimiser le nombre d'animaux, des informations seront obtenues aux niveaux phénotypiques, cellulaires et moléculaires à partir du même animal. Ces observations permettront d'identifier une altération d'un ou plusieurs tissus. Elles seront alors poursuivies par l'utilisation de méthodes alternatives (cultures cellulaires appropriées 2D/3D et reconstitution *in vitro* d'organes à partir de cultures cellulaires) qui éviteront l'utilisation d'animaux pour la suite du projet.

- Raffiner les animaux seront suivis quotidiennement afin d'assurer leur bien-être et les expérimentations seront arrêtées avant la souffrance des animaux

15826 L'amaurose congénitale de Leber (ACL) est la plus sévère et la plus précoce des dystrophies rétiniennes, responsable d'une cécité ou déficience visuelle sévère dès la naissance ou au cours des premiers mois de vie. Aujourd'hui, il n'existe aucun traitement curatif pour ce type de maladie.

Une approche thérapeutique est actuellement développée pour une mutation particulièrement fréquente du gène le plus souvent en cause dans une de ces terribles affections héréditaires de la rétine. Cette approche est basée sur l'utilisation de molécules ayant déjà fait leurs preuves dans d'autres pathologies. Récemment, l'efficacité et le potentiel thérapeutique de ces molécules ont été démontrés pour corriger cette mutation dans des cellules de patients atteints de la maladie étudiée et porteurs de la mutation d'intérêt.

Aujourd'hui, notre projet est de réaliser la preuve de concept préclinique de l'efficacité thérapeutique et de l'innocuité *in vivo* de ces molécules dans le tissu rétinien après une injection intravitréenne. Le recours au modèle animal s'avère indispensable avant d'envisager un développement clinique de ce type de molécule chez l'homme. Pour notre projet, nous avons choisi comme modèle animal une souris transgénique dont l'organisation structurale de la rétine est proche de celle de l'homme.

Notre projet consiste à créer un modèle murin porteur d'une mutation responsable d'un phénotype oculaire semblable à celle du patient humain. Une fois le phénotype de l'animal caractérisé, les molécules thérapeutiques à tester seront injectées dans le vitré de l'œil gauche des souris anesthésiées. L'œil droit de chaque animal utilisé servira de contrôle ce qui permettra d'une part de réduire la souffrance et/ou la gêne qui peut être causée suite à l'injection, et d'autre part d'éviter d'utiliser un groupe de souris « témoin » pour chaque étude.

Tout au long du projet les animaux seront observés quotidiennement afin de s'assurer de leur bien-être. A la fin de l'étude, tous les animaux seront anesthésiés pour noter l'évolution électrorétinographique, puis sacrifiés pour études moléculaire et histologique. Dans le cas où les traitements pharmacologiques ou manipulations seraient à l'origine de douleurs visibles, de détresse ou de signes de toxicité, le traitement serait interrompu et, si nécessaire, la mise à mort de l'animal serait anticipée.

Le nombre d'animaux est estimé à 628 souris sur 4 ans.

Les résultats de ce projet permettront d'effectuer la preuve de concept préclinique de l'efficacité thérapeutique des molécules sélectionnées après injection intravitréenne.

15827 Les myopathies centronucléaires (MCN) sont un groupe de maladie musculaire d'origine génétique, provoquant un déconditionnement musculaire (perte de masse et de force musculaire) chez les individus atteints. La forme autosomale dominante (MCN-AD) de ces pathologies est principalement provoquée par la mutation du gène Dynamine 2. Le modèle murin de cette pathologie, la souris KI Dnm2R465W+/- (KI, myopathe) exprime à l'état hétérozygote la mutation la plus fréquemment retrouvée chez l'homme et se caractérise par une atteinte musculaire modérée avec retard de croissance musculaire entre 4 et 8 semaines d'âge associé à des anomalies mitochondriales, organelles responsables de la production d'énergie dans les cellules. Plusieurs éléments bibliographiques suggèrent que la dynamine 2 pourrait contribuer au déconditionnement musculaire en modulant l'activité du récepteur aux œstrogènes, principale hormone féminine. Notre hypothèse est que la mutation dynamine 2 chez souris KI interfère avec le recyclage du récepteur aux œstrogènes, entraînant alors sa dégradation et provoquant in fine le déconditionnement musculaire ainsi que l'apparition d'anomalies mitochondriales.

Nos objectifs sont donc de déterminer si

- 1) une activation du récepteur alpha aux œstrogènes (E α) par son ligand naturel (17- β œstradiol = E2) ou sa régulation par le tamoxifène empêche la mise en place la myopathie chez la souris KI,
- 2) à l'inverse si l'inhibition du récepteur aux œstrogènes par le fulvestrant amplifie le phénotype pathologique chez des souris KI mâles et femelles ou déclenche le phénotype pathologique chez des souris de type sauvage mâles et femelles.

Pour répondre à ces questions 5 groupes de souris mâles (20 sauvages + 20 myopathes par groupe), et 2 groupes de souris femelles (20 sauvages + 20 myopathes par groupe) soit 280 souris au total, seront étudiés. Les groupes diffèrent par le traitement administrés (E2, fulvestrant, tamoxifène, miglyol, ou aucun traitement pour les mâles fulvestrant et miglyol pour les femelles). Le miglyol est l'adjuvant nécessaire aux injections sous-cutanées de E2 et du fulvestrant et est administré aux groupes contrôles pour ces drogues. Compte tenu que le tamoxifène est administré via l'alimentation son groupe de souris contrôle ne subira aucun traitement mais aura à disposition la même quantité d'alimentation que le groupe traité.

Dans ce projet nous cherchons à évaluer l'impact que le système endocrinien peut avoir sur la régulation de la masse musculaire et ce, en fonction des sexes et de l'administration de molécules pharmaceutiques. Ces études ne peuvent donc être réalisées autrement que *in vivo*.

Le nombre d'animaux par groupe a été réduit au maximum afin de réaliser une étude statistique solide malgré le risque de variabilité interindividuelle inhérent aux actions des molécules administrées.

La mise en place et l'évolution de la maladie chez les souris KI a été décrite et caractérisée au sein du laboratoire, ce qui nous permet de mettre en place une surveillance de différents points limites pour le respect du bien-être animal.

Pendant toute la durée du protocole, les animaux bénéficieront d'une attention et de soins de qualités réalisés par du personnel qualifié afin d'assurer le bien-être des animaux. Par ailleurs, les animaux seront hébergés en groupes harmonieux, par deux, dans un environnement enrichi (copeaux, matériel de nidification et bâtonnets à ronger). Enfin, l'eau et la nourriture seront mises à disposition « ad libitum » et de la musique sera diffusée en salle d'hébergement pour diminuer le stress et atténuer les bruits environnementaux.

15828 Avec l'allongement de l'espérance de vie, la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est la première cause de cécité dans les pays développés. Dans cette maladie, au niveau de la rétine, un dysfonctionnement de l'épithélium pigmenté (RPE) entraîne la dégénérescence des photorécepteurs, les cellules sous-jacentes qui captent la lumière et forment le message visuel. La préservation de ces photorécepteurs représente donc un enjeu de santé majeur.

Dans la rétine, trois types cellulaires expriment le facteur de transcription Otx2 le RPE, les photorécepteurs et les cellules bipolaires. Au laboratoire, nous disposons d'un modèle de souris mutante où l'expression d'Otx2 est supprimée dans toutes les cellules de la rétine, provoquant la dégénérescence sélective des photorécepteurs et mimant ainsi la DMLA. Nos données préliminaires suggèrent que cette perte d'expression d'Otx2 affecte en priorité le RPE, mais une fonction d'Otx2 au sein même des photorécepteurs ou dans les cellules bipolaires ne peut pas être écartée.

Dans ce projet, nous supprimerons l'expression d'Otx2 dans un ou plusieurs types cellulaires de la rétine, et analyserons l'effet de cette perte d'expression sur la survie à long terme des photorécepteurs. Ce projet permettra de tester l'hypothèse selon laquelle Otx2 pourrait être transférée entre cellules voisines et exercer un effet neuro-protecteur par ce biais. L'hypothèse de transfert sera testée de deux façons d'une part, une protéine Otx2 étiquetée (pour être distinguée de la protéine endogène) sera exprimée dans le RPE, et sa présence sera recherchée ensuite dans les photorécepteurs. D'autre part, nous induirons l'expression d'anticorps anti-Otx2 qui supprimeront toute protéine Otx2 extracellulaire et nous analyserons la survie des photorécepteurs dans ces conditions. Enfin, si ce transfert est avéré, nous étudierons le mécanisme de sécrétion, et nous testerons les effets protecteurs de la protéine Otx2 extracellulaire dans un modèle de dégénérescence rétinienne déjà établi.

Cette étude permettra de comprendre les mécanismes de protection des cellules photosensibles de la rétine par la protéine Otx2 et ouvrira de nouvelles perspectives pour le traitement de la DMLA. La DMLA touchant un organe complexe, impossible à reconstituer *in vitro*, il est nécessaire d'avoir recours à des études *in vivo*.

Nous appliquerons la règle des 3 R

Remplacer En parallèle des expérimentations sur l'animal, nous effectuons des expériences *in vitro* dans des lignées cellulaires pour tester les propriétés de la protéine Otx2.

Raffiner Nos conditions d'élevage incluent stabulation par 4-5 animaux, enrichissement du milieu, température et hygrométrie contrôlée et suivi quotidien des animaux. La majorité des procédures pourront générer un inconfort faible et de courte durée, mais non dommageable pour l'animal. Pour les procédures compromettant le bien-être de l'animal, un suivi rapproché permettra de détecter une souffrance potentielle et de décider du devenir de l'animal au cours de l'expérimentation, notamment par la mise en œuvre de point limites précoces et adaptés ^[1]_[SEP].

Réduire Nous limiterons la taille des échantillons à ce qui est strictement nécessaire pour garantir une puissance statistique acceptable. Pour limiter le nombre d'animaux produits nous utiliserons indifféremment des animaux des deux sexes. Enfin, certaines procédures ne seront réalisées que dans le cas où les procédures et expériences précédentes auront donné des résultats les justifiant. Le nombre total de souris prévu pour ce projet est 727

15829 L'incontinence fécale est définie comme "une émission involontaire ou inappropriée de fèces" ou comme une émission incontrôlée récurrente de matières fécales pendant un mois au moins.

On peut estimer la prévalence de l'incontinence fécale à environ 10%. Elle peut augmenter avec l'âge jusqu'à plus de 10 % chez les sujets issus de la population générale, pour avoisiner 50 % chez des patients vivant en institution.

L'incidence de la maladie chez les adultes varie, elle aussi, en fonction du sexe elle est 9 fois plus fréquente chez les femmes de 45 ans que chez les hommes et les femmes de 65 ans sont exposées à un plus grand risque que les hommes en raison des lésions obstétricales. Les sous-estimations de la prévalence sont courantes car de nombreux patients sont réticents à rapporter des symptômes d'incontinence ou à rechercher une aide.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet de candidats médicaments sur la fonction fécale en condition physiologique et/ou d'incontinence par mesure du comportement de défécation ainsi que par la mesure de l'activité des muscles du sphincter anal (technique appelé électromyographique EMG) ou de la pression intra rectale chez le rat anesthésié ou éveillé. Le choix du rat permettra d'effectuer des études comportementales en parallèle des études de mesure de l'activité musculaire. En effet, les modèles d'incontinence provoqués par lésion musculaire ou nerveuse sont des modèles expérimentaux classiquement développés chez le rongeur (rat, souris). De plus, l'exploration comportementale de la fonction anale chez l'animal éveillé (quelle que soit la pathologie) est largement décrite au niveau international chez le rat. Pour les études d'enregistrement de l'activité musculaires, l'animal sera anesthésié afin de diminuer la douleur, les études comportementales se feront sur animal éveillé. Le choix du modèle dépendra de la fonction étudiée et de la cible pharmacologique visée par le candidat médicament.

Actuellement, les méthodes alternatives *in vitro* et *ex vivo* permettant une évaluation de la fonction anale dans son ensemble n'existent pas c'est pourquoi le recours à l'expérimentation animale est nécessaire pour comprendre et traiter l'incontinence fécale.

Dès leur arrivée dans la zone d'exploration fonctionnelle, les animaux seront hébergés dans des conditions définies par la directive européenne 2010/63/UE. Une attention particulière sera apportée à la surveillance des animaux et à leur suivi lors de la mise tout au long de ce projet étant donné que pour une partie du projet, il s'agit de mise en place et qu'il est difficile de prévoir les signes de détresses. Cependant, une observation journalière de leur comportement (difficulté à se nourrir, se déplacer, à se toiletter) sera réalisée. Si un animal montrait un comportement atypique tels que altérations des fonctions normales (alimentation/hydratation, déplacement, toilettage, ...), comportement atypique (vocalisation, prostration, agressivité vis-à-vis de ces congénères,...), une perte de poids inférieure à 20% du poids initial, l'animal serait isolé et des croquettes hydratées seront placées dans la cage ainsi que la réalisation d'une injection sous-cutanée de sérum physiologique afin de faciliter la prise de nourriture et l'hydratation. Si l'état général de l'animal ne s'améliorait pas après 48h et qu'aucune solution ne pouvait être apportée en concertation avec le vétérinaire référent et la structure du bien-être animal, ce dernier serait mis à mort.

Le nombre d'animaux nécessaire à ce projet sur 5 ans sera de 3355 rats. En raison de 20 par groupe pour les mises au point et 15 rats par groupe pour tester des candidats médicaments pour en inclure au moins 10 rats par groupe (minimum nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs), le nombre de groupe étant fonction du nombre de molécules et/ou doses à tester

En accord avec la règle de raffinement, toutes les procédures chirurgicales seront réalisées sous anesthésie générale avec maintien de la température corporelle via l'utilisation de plaque chauffante thermo-régulée. Le réveil des animaux sera surveillé attentivement et l'état général des animaux contrôlé quotidiennement.

Ainsi, ce projet sera réalisé selon les exigences de la règle des 3-R (remplacement, réduction et raffinement).

15830 Le changement climatique a de nombreux impacts sur la qualité de l'eau dans laquelle vivent les poissons d'élevage. Or les poissons sont des animaux très sensibles à la qualité de l'eau, milieu

dans lequel ils vivent. Notamment, la dégradation du taux d'oxygène et l'augmentation de la température sont amenées à s'accroître avec le changement climatique avec, en particulier, des augmentations soudaines et fortes. Dans les piscicultures, des solutions techniques existent pour gérer les paramètres de qualité d'eau, cependant elles sont coûteuses et énergivores et elles ne sont donc pas déployées dans toutes les piscicultures. Ainsi, l'obtention par sélection de poissons robustes, plus tolérants face à une qualité d'eau non optimale, est une option intéressante car ces poissons pourraient être diffusés dans toutes les piscicultures, y compris celles qui ne disposent pas des moyens techniques pour lutter contre les variations de milieu. Cela permettrait donc aux entreprises d'être moins dépendantes des conditions de milieu et d'être plus résilientes face au changement climatique et de contribuer à un meilleur bien-être des animaux.

Les expériences décrites dans ce projet visent plus précisément à fournir des résultats permettant de concevoir une sélection efficace et pertinente pour la résistance à la température et à l'hypoxie et notamment l'étude de la variabilité génétique et la compréhension des mécanismes d'adaptation de la truite arc en ciel à des stress de température et d'hypoxie. Plus précisément, ce projet se concentre sur 1/ la variabilité génétique de la résistance à un stress aigu de température ou d'hypoxie 2/ la corrélation entre la résistance à ces deux stress et 3/ vise également à examiner les différences pour les caractéristiques comportementales et physiologiques entre poissons résistants ou sensibles à la température.

Le matériel biologique sera constitué de 6 lignées isogéniques hétérozygotes de truite arc-en-ciel, choisies en fonction de leur réponse connue à la température. Chaque lignée est issue du croisement par fécondation classique de deux parents totalement homozygotes. Dans une lignée, tous les individus possèdent le même génotype mais sont hétérozygotes. Ces lignées ont déjà été caractérisées pour leur réponse à la température mais les mécanismes (comportementaux et physiologiques) n'ont pas encore été étudiés. Leurs réponses à l'hypoxie ne sont pas encore connues ni la corrélation avec la résistance à la température.

Ce projet requiert trois procédures soumises à autorisation. Les lignées seront identifiées et mélangées pour subir des tests aigus de température ou d'hypoxie. Ces tests permettront de savoir s'il existe de la variabilité génétique pour ces caractères et donc s'ils pourraient être sélectionnés. Des tests de comportement seront réalisés sur des poissons individuellement ou en groupe en conditions normales de température ou lors d'une élévation de température pour chaque lignée. Des prises de sang seront réalisées sur les poissons anesthésiés après le suivi d'activité pour évaluer des paramètres sanguins. Ces analyses de comportement et de physiologie permettront de comprendre ce qui différencie un poisson résistant à la température ou à l'hypoxie d'un poisson sensible, ce qui permettrait à terme d'avoir de nouveaux critères pour évaluer la résistance des animaux et donc de limiter les tests aigus et ainsi les stress imposés aux poissons. Toutes les mesures sont réalisées au stade juvénile, sur des poissons de 10 à 40g.

Notre projet s'inscrit dans une démarche compatible avec la règle des 3R.

Remplacer La procédure proposée ne pourra être mise en œuvre que sur poissons vivants car, pour l'instant, aucun modèle de laboratoire fiable n'existe pour caractériser les capacités d'adaptation de la truite arc en ciel en réponse à un stress de température ou d'hypoxie

Réduire : Nous avons recours à un matériel biologique original, les lignées isogéniques de truite-arc-ciel (animaux génétiquement identiques au sein de chaque lignée), ce qui nous permet de réduire le nombre de poissons analysés tout en gardant une puissance statistique forte pour détecter des différences significatives. Nous mutualiserons le matériel biologique autant que possible avec d'autres chercheurs.

Raffiner : avant et pendant les procédures, une surveillance du comportement des animaux est effectuée pour réduire au minimum la douleur, la souffrance et l'angoisse subies. Pour les tests aigus de température et d'hypoxie qui sont des procédures sévères, les poissons sont observés en continu et dès que l'un d'entre eux perd l'équilibre plus de 5 secondes, il est pêché et euthanasié. Pour les tests de comportement qui sont des procédures légères, les poissons sont également suivis en continu et les poissons au comportement anormal (léthargie, perte d'équilibre) seront pêchés et euthanasiés.

Nous prévoyons d'utiliser au total 2058 poissons sur une durée de 1 an

150 poissons pour adapter le test d'hypoxie à notre dispositif, 1800 poissons (50 poissons * 6 lignées * 2 tests – température ou hypoxie * 3 réplicats) pour les tests aigus de température et d'hypoxie et 108 poissons pour les tests de comportement et les mesures physiologiques.

15831 En élevages de poulets de chair, et quel que soit le type de production (en bâtiment ou en plein air), la colibacillose aviaire causée par certaines souches bactériennes spécifiques d'*Escherichia coli*, nommées APEC, est la pathologie infectieuse bactérienne la plus fréquente. Lorsque les animaux sont fragilisés par des mauvaises conditions environnementales ou par une infection virale, ces bactéries qui nichent dans l'intestin (réservoir) peuvent disséminer dans l'organisme soit par passage au travers la paroi intestinale soit par contamination respiratoire. Cela peut ainsi engendrer divers syndromes : infections osseuses ou respiratoires pouvant évoluer en septicémie. Ces affections nécessitent un traitement antibiotique, favorisant ainsi la sélection de bactéries résistantes et entraînant parfois le recours aux antibiotiques dits critiques. Dans le cadre de la réduction des usages d'antibiotiques, des solutions préventives, à base d'huiles essentielles sont souvent utilisées en élevages avicoles.

Ces additifs pourraient agir directement sur le microbiote par leurs propriétés antimicrobiennes mais également indirectement, par des activités diverses (écologiques, antioxydantes, régulation de l'immunité).

Le présent projet vise à évaluer l'effet de 4 solutions commerciales, à base d'huiles essentielles identifiées et sélectionnées préalablement sur la base de retours d'usage terrain et de tests d'efficacité *in vitro*, comme pouvant jouer un rôle bénéfique sur le tractus digestif en limitant la colonisation de l'intestin par les souches APEC. Ce projet nécessitera l'utilisation de 140 poulets de chair à croissance rapide dans le respect de la règle des 3Rs afin de pouvoir caractériser l'efficacité de ces solutions préventives, contre le portage intestinal des APEC.

Pour ce faire, une souche APEC, sélectionnée préalablement *in vitro* pour sa sensibilité à des huiles essentielles, sera administrée par voie orale à des animaux à 5 jours d'âge. Puis, son implantation dans l'intestin sera suivie, ainsi que l'évolution de la flore commensale, en fonction de la supplémentation. La distribution des solutions à base d'huiles essentielles sera dans l'eau de boisson 3 jours avant et 2 jours après l'infection par *E. coli*. Le suivi de la charge bactérienne s'effectuera sur prélèvements en cinétique de fientes durant 28 jours.

Remplacement : L'effet des huiles essentielles sur la flore intestinale et le portage de souches pathogènes dans l'intestin, de par les différents mécanismes susceptibles d'être mis en jeu, ne peuvent pas être remplacés par des approches *in vitro*.

Réduction Le nombre d'animaux par lot est adapté aux buts de cette expérimentation, preuve d'efficacité de produits avec comparaison à des témoins positifs (infecté et traité avec un antibiotique) négatif (infecté et non traité) et un contrôle d'essai (non infecté et non traité). Au préalable, la sensibilité de 5 souches d'*E. coli* aux solutions commerciales à base d'HE sera évaluée *in vitro* (phytogramme). Les HE sélectionnées seront celles efficaces *in vitro* sur la souche d'*E. coli* qui sera testée lors de l'expérimentation animale et qui montreront globalement le plus d'effet sur l'ensemble des souches d'*E. coli*.

Raffinement Les animaux sont maintenus dans des hébergements adaptés en taille, au sol sur paille broyée dans des conditions environnementales confinées contrôlées, avec nourriture et boisson à volonté. Ils bénéficient d'un enrichissement social et comportemental.

15832 Les tumeurs cérébrales gliales, ou gliomes, sont les tumeurs primitives les plus fréquentes du système nerveux central représentant la 3ème cause de mortalité chez les jeunes adultes. Des données épidémiologiques estiment que le nombre de cas de glioblastome, un gliome de haut grade très invasif, enregistré en France est de 3,34/100 000 adultes chaque année. Avec aucun traitement vraiment efficace, la médiane de survie est estimée à 14,6 mois après chirurgie puis traitement combiné (radiothérapie et chimiothérapie). Le traitement de gliomes invasifs dont le glioblastome nécessite dès que possible l'exérèse complète de la masse tumorale qui laisse place à une cavité

souvent laissée vide. Dans le cas des glioblastomes, la raison principale d'un pronostic sombre est la présence de récives systématiques en bordure de la cavité de résection (exérèse). En effet, les gliomes de haut grade sont extrêmement invasifs et au moment du diagnostic et de la résection, de nombreuses cellules tumorales ont déjà infiltré le parenchyme cérébral sain. Face à l'échec de toutes les thérapeutiques actuelles en cours d'essai et puisque la présence de cellules cancéreuses disséminées dans le cerveau du fait de l'invasion rend la résection chirurgicale incomplète et limite l'accessibilité aux thérapies, notre équipe propose d'exploiter le potentiel invasif des cellules de gliomes, dans le but de les guider et les concentrer dans des localisations spécifiques, des pièges à base d'hydrogels biocompatibles, dans lesquels une thérapie locale pourrait être délivrée efficacement. Notre hypothèse porte donc sur l'utilisation de la cavité de résection chirurgicale pour introduire un hydrogel biocompatible contenant une ou plusieurs molécules chimiokines attractantes qui servira de piège, et pourra être enrichie en thérapeutiques locales. La migration des cellules disséminées dans le tissu cérébral pourrait être redirigée vers la cavité contenant l'hydrogel à partir d'un gradient de concentration de chimiokines. Pour cela, des souris seront utilisées pour mesurer la croissance tumorale (glioblastome) *in vivo*, par injection de quatre types de cellules tumorales dans le cerveau. Puis une exérèse chirurgicale sera réalisée et un hydrogel sera injecté liquide dans la cavité de résection, pour solidifier dans les quelques minutes. Cet hydrogel pourra contenir différentes molécules attractantes vis-à-vis des cellules tumorales et/ou des chimiothérapies, ou encore des cellules libérant des molécules attractantes ou tueuses associée à une chimiothérapie. Dix conditions différentes seront étudiées. L'impact de la présence d'une tumeur cérébrale et/ou de sa résection sur la mémoire, la dépression, l'anxiété sera évaluée grâce à différents tests comportementaux. Ces tests seront réalisés avant la résection et à différents délais après la résection afin de vérifier l'effet bénéfique de celle-ci et de l'hydrogel « piège à cellules ».

De plus, les cerveaux de ces souris seront prélevés et permettront d'étudier les voies d'invasion des cellules tumorales, la prolifération et mort cellulaires, et de mettre en évidence la capacité des cellules tumorales à être piégées au sein des hydrogels en réponse à des molécules attractantes et/ou des chimiothérapies.

Chaque groupe de souris comprendra 15 individus dans le cas des études comportementales ou 12 individus dans le cas des études neurobiologiques sur cerveau entier. Un total de 3822 animaux sera donc utilisé. Tout au long du projet, la règle des 3R sera respectée. Le modèle murin est indispensable afin de pouvoir travailler sur une tumeur dans un environnement cérébral et de tester différentes molécules attractantes et thérapeutiques. Durant l'ensemble des opérations (injections de cellules ou résection), les souris seront anesthésiées. Une prise en charge de la douleur potentielle sera systématiquement effectuée. Un suivi bi-quotidien (dans les 48h post-chirurgie) puis quotidien sera effectué par du personnel formé et expérimenté et permettra de détecter l'apparition d'un éventuel signe de souffrance et de mettre en place une procédure de prise en charge analgésique si nécessaire. L'ensemble des conditions d'hébergement des animaux (cages, enrichissement et environnement) sera conforme à la réglementation. La mise à mort des souris permettant le prélèvement des échantillons biologiques sera réalisée après anesthésie et en accord avec le cadre réglementaire.

15833 La neurotensine (NTS) est une hormone intestinale libérée principalement par des cellules de l'intestin grêle suite à une alimentation riche en graisse. Chez l'Homme, une concentration élevée de neurotensine est liée à l'obésité, au diabète et aux maladies cardiovasculaires. Dans le cerveau la neurotensine facilite la locomotion, elle est également une hormone du stress. Elle facilite le tonus dopaminergique, donc l'activité. Elle a aussi une action anorexigène. En parallèle à ces observations il a été également largement démontré dans différents types de cancer que la neurotensine et son récepteur de haute affinité contribuaient à la progression tumorale.

Dans ce contexte nous avons développé un médicament anti tumoral sous la forme d'un anticorps anti neurotensine qui fait baisser la croissance tumorale et les métastases.

Dans ce projet, nous souhaitons étudier l'impact de cet anticorps anti neurotensine sur le métabolisme d'un animal, engendrée par un régime riche en graisse. Dans un premier volet, nous souhaitons évaluer si l'anticorps anti neurotensine limite la prise de poids induite par un régime riche

en graisse et modifie les paramètres biologiques. Dans un second volet, nous souhaitons induire une obésité chez des animaux en leur mettant à disposition de façon ad libitum un aliment riche en lipides. Lorsque l'obésité sera atteinte, nous évaluerons si l'anticorps anti neurotensine influence le poids et les paramètres biologiques associés aux poids lorsque les animaux seront remis sous un régime normal. Ce protocole vise à simuler la problématique de l'obésité humaine acquise et la recherche de facteurs qui pourraient améliorer la perte de poids associée ou non à l'activité physique. La neurotensine est un peptide pluripotent agissant comme une hormone et un neurotransmetteur. En périphérie, il agit sur le système gastro-intestinal. Les effets de l'anticorps que nous développons sont par conséquent la résultante de l'inhibition de tous ces systèmes. Notre projet est donc un travail de physiologie intégrée qui permettra de comprendre les régulations physiologiques et métaboliques inter organes. Aucun modèle cellulaire ne permet de reproduire cette situation. Il n'est pas possible de recréer *in vitro* la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs cellulaires entrant en jeu. Ce système prenant en compte l'intégrité de l'animal est essentiel pour préparer le développement clinique de cet anticorps.

Les animaux

* Type souche de souris immunocompétente C57Bl6/J

* Nombre Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 240 souris pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction dans l'article

R. 214–105 « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

La conformité au principe des 3R

* Remplacement Un système vivant est nécessaire pour étudier les acteurs mis en jeu dans notre étude sur l'effet d'un anticorps sur le poids et le métabolisme des graisses. Il n'est pas possible de recréer *in vitro* la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs cellulaires rentrant en jeu.

* Réduction Nous limitons au maximum le nombre d'animaux par groupe de façon à obtenir des résultats statistiquement fiables. A cause des variabilités inter-animales et intergroupes, un nombre trop restreint d'animaux engendrerait des résultats trop variables et non valides. Compte tenu des données de la littérature (variabilité attendue) et des effets espérés, un test de puissance statistique a été utilisé pour déterminer le nombre minimum d'animaux nécessaire pour cette étude.

* Raffinement Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures ont été mise au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal, en limitant la douleur et le stress. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation, les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum. Le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification ou de maison de type igloo. Nous nous efforçons à chaque instant de raffiner nos procédures afin de garantir le bien-être des animaux en cours de procédure grâce à une surveillance attentive, des soins adaptés et nous avons défini des points limites l'apparence physique, la mesure du poids, et le comportement.

15834 Les allergies alimentaires concernent 8% des enfants et 4% des adultes et représentent un enjeu de santé public et économique. De plus la fréquence et la sévérité de ces allergies sont en constante augmentation. 40% des enfants présentant une allergie alimentaire souffrent de réaction sévère telle que le choc anaphylactique. Immunologiquement, les allergies alimentaires sont causées par des réactions allergiques de type 1 avec une réponse exagérée et incontrôlable des cellules immunitaires. Cliniquement, elles sont caractérisées par une inflammation locale de la muqueuse buccale, de la gorge, du visage et du tractus digestif. Elles sont également fréquemment associées à des réactions cutanées.

Pour mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'allergie alimentaire et établir de nouveaux traitements, les modèles animaux sont indispensables. En effet, les modifications physiopathologiques nécessaires au développement de cette pathologie sont très complexes et nécessitent la mobilisation d'effecteurs cellulaires et moléculaires très nombreux et la rupture dans

la coordination de leur intervention. Il est impossible d'explorer l'ensemble de ces événements par une approche substitutive de culture cellulaire.

Ce protocole consiste à sensibiliser les animaux à l'aide d'un allergène afin qu'ils produisent des anticorps dirigés contre cette molécule. Le plasma contenant ces anticorps sera ensuite prélevé pour être analysé. Cette étude comportera 60 rats, à raison d'une étude par an, nous utiliserons 300 rats au cours de ce projet.

Nous utiliserons le nombre minimum de rats nécessaire à la production d'un stock suffisant de plasma afin de ne pas répéter cette expérience. D'autre part, un raffinement des protocoles sera effectué en fonction des avancées technologiques dans le domaine. Les rats sont hébergés selon les conditions de la nouvelle réglementation 2010/63 en unités individuelles ventilées de type III ou IV avec enrichissement de l'environnement (composants de nidification et tunnel). Chaque animal entrant dans une étude disposera d'une fiche individuelle de suivi sur laquelle tout traitement et observation seront reportés. L'état de santé des animaux sera évalué quotidiennement selon des critères définis par l'AFSTAL (association française des sciences et techniques de l'animal de laboratoire), d'apparence physique (perte de poids significative, gêne respiratoire) et comportementaux (animal prostré, agressivité) définis en accord avec le comité de suivi du bien-être animal de notre établissement. Une dégradation trop importante de l'état de santé entraînera l'arrêt immédiat de l'expérimentation.

15835 Les épidermolyses bulleuses dystrophiques (EBD) sont des maladies génétiques cutanées rares qui engagent le pronostic vital du patient. Il a été démontré que les EBD sont dues à des mutations du gène du collagène VII (COL7A1) qui entraînent une absence de formation de fibres d'ancrage fonctionnelles. Les formes les plus sévères se traduisent par une fusion des doigts et des orteils, des rétractions articulaires, de la malnutrition, de l'anémie et des infections. L'apparition de carcinomes épidermoïdes cutanés agressifs représente la première cause de décès chez ces jeunes patients. Actuellement, il n'existe pas de thérapie spécifique et les soins apportés aux patients sont uniquement palliatifs.

La validation des approches thérapeutiques testées a déjà été effectuée *in vitro* sur des modèles cellulaires. Mais la compréhension globale de la physiopathologie de l'EBD ainsi que le développement d'approches thérapeutiques doivent être effectués *in vivo* afin de tester les voies d'administration adéquates des composés et leur biodisponibilité.

La souris reste le meilleur modèle de petit animal pour l'étude des pathologies cutanées. Les modèles drosophiles et zebrafish ne sont pas pertinents car ils ne présentent pas de structures cutanées proches de la peau humaine. En effet, il existe une grande homologie structurale entre la peau de la souris et de l'homme.

Des modèles murins ont donc été développés afin de mieux comprendre la physiopathologie de ces maladies et de tester des approches thérapeutiques spécifiques 3 modèles de souris génétiquement modifiées et un modèle de xénogreffe de peaux humaines reconstruites greffées sur des souris immunodéficientes.

L'objectif du projet sera de mieux comprendre la physiopathologie de l'EBD au cours du temps par la caractérisation de ces nouveaux modèles murins de l'EBD. De plus, de nouvelles approches thérapeutiques seront développées et testées sur les souris EBD afin de tester leur efficacité. L'imagerie multimodale sera utilisée afin de suivre le devenir des molécules thérapeutiques ce qui permettra de sélectionner le meilleur traitement.

Dans un esprit de réduction du nombre d'animaux, les étapes de développement des approches thérapeutiques ont préalablement été réalisées *in vitro*.

Dans ce projet, un total de 1855 animaux est estimé pour une durée de 5 ans. Il s'agit du nombre d'animaux jugé nécessaire pour obtenir des résultats analysables, en incluant les répétitions indispensables à la démonstration.

Ce projet comporte plusieurs procédures xénogreffe de peaux humaines reconstruites sur les souris, diverses injections, imagerie *in vivo* et caractérisation de modèles murins.

Afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, une anesthésie sera pratiquée pour toute chirurgie et les procédures se dérouleront avec une surveillance journalière. La greffe de peau est une chirurgie peu invasive ne laissant pas de plaie ouverte, le greffon étant suturé à la peau adjacente. Une fois la souris profondément anesthésiée, la peau du dos est incisée afin de réaliser un volet cutané. Le greffon est ensuite suturé et protégé avec un film de silicone chirurgical (silastic) puis le volet cutané est refermé et suturé sur le greffon. La plaie est ensuite protégée par des bandages afin d'éviter toutes complications liées à une surinfection.

Les soins post-opératoires sont essentiellement constitués de changement de pansement durant 7 jours et du traitement de la douleur modérée par des antalgiques. Les antalgiques seront administrés systématiquement en pré- et post-opératoire et pourront être administrés en cas de nécessité dans les autres procédures. Enfin, des points limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

L'environnement sera enrichi par l'ajout de maisonnette en carton, du coton pour la nidation, des bâtonnets à ronger et un tunnel.

A terme, les résultats précliniques de ce projet permettront de développer de nouvelles thérapies géniques et cellulaires ayant le potentiel d'améliorer la prise en charge thérapeutique des patients.

15836 Notre moelle osseuse produit toutes les cellules du sang (globules blancs, globules rouges et plaquettes) à partir de cellules immatures nommées cellules souches hématopoïétiques (CSH). GATA2 est un gène codant un facteur de transcription essentiel à l'émergence des CSH de l'embryon jusqu'à la naissance et dans le maintien de ces cellules au cours de la vie. GATA2 est exprimé majoritairement dans les CSH. Des mutations génétiques sur ce gène ont été identifiées et ont comme conséquences des événements cliniques tels que des déficits du système immunitaire aboutissant à des infections bactériennes ou virales récurrentes chez des patients entre 10 et 20 ans. Lors des infections, les CSH doivent normalement générer rapidement des cellules de défense pour combattre les pathogènes. Les patients avec un déficit en GATA2 montrent cependant une diminution de ces cellules. De plus, 80% des patients évoluent vers des pathologies cancéreuses comme des cancers du sang (leucémies). La transformation des CSH en cellules cancéreuses reste un enjeu majeur dans la compréhension de cette maladie.

Le but de ce projet est de savoir si la stimulation des CSH lors d'infections chez les patients enclenche un processus d'initiation cancéreuse chez des souris déficientes en Gata2. Pour cela, nous allons mimer chez les souris par traitement biologique stérile (utilisation du Lipopolyisaccharide LPS) ou par traitement chimique (utilisation du 5-Fluorouracile 5-FU) l'effet de l'infection. Les modifications sur l'hématopoïèse seront suivies au cours du temps sur des souris portant une mutation sur Gata2, ayant perdu une copie de ce gène ou des souris sauvages qui serviront de contrôle.

Nous respecterons la règle des 3R : remplacement, réduction et raffinement. Pour cela nous prendrons les mesures suivantes :

Remplacement (pourquoi les animaux doivent être utilisés et pourquoi des alternatives non animales ne peuvent être utilisées) pour comprendre l'impact des infections dans l'évolution de cette maladie, nous avons créé un modèle avec une mutation dans le gène Gata2. Les patients mutés en GATA2 ont un risque accru d'évolution vers des cancers du sang et ce suite à des infections multiples. Il est néanmoins très difficile de travailler sur les CSH chez les patients car le prélèvement de moelle osseuse est un geste invasif et ne doit être réalisé seulement dans des cas exceptionnels. La production des cellules du sang se fait grâce à des mécanismes et des gènes très conservés entre l'espèce humaine et murine.

Réduction : Les études sur l'animal sont réalisées après une étude bibliographique détaillée afin d'optimiser nos protocoles pour réduire au maximum le nombre d'animaux. Des études statistiques (t-test et courbe de survie) nous permettent également de déterminer le nombre minimum de souris nécessaires afin que l'expérience ait une valeur scientifique et n'ait pas besoin d'être reproduite. 3 modèles murins seront utilisés pour ce projet (deux modèles présentant un déficit en Gata2 et des souris sauvages).

Raffinement : En plus des considérations éthiques, nous n'employons que des personnes formées à la manipulation des animaux et soucieuses à chaque étape du bien-être de l'animal. Les conditions d'hébergement doivent être optimales en respectant les besoins primordiaux de l'animal (surveillance journalière sans stresser l'animal, non isolement et non surpeuplement des cages, changement très régulier de la nourriture, la boisson et la litière dans la cage). Les animaux sont surveillés quotidiennement par du personnel expérimenté afin de détecter les signes de souffrance. L'évaluation quotidienne de la souffrance nous permet de déterminer si l'expérience doit être arrêtée. Les animaux seront observés tous les jours, dès le moindre signe pathologique (perte de plus de 20% du poids, prostration, poil hirsute etc.) les animaux seront sacrifiés par dislocation cervicale et analysés.

Points limites de l'étude :

Perte de poids rapide (15 à 20% en quelques jours).

Poil hérissé, dos rond, abdomen distendu ou léthargie spécialement si état débilité associé ou si le signe est prolongé (3 jours).

Signes d'atteinte du SNC inclinaison de la tête, tremblements, spasticité, convulsion, tourner en rond ou parésie notamment si le signe est associé à une anorexie.

Paralysie.

Croissance rapide d'une ou plusieurs masses, signes cliniques de leucémies.

Automutilations persistantes.

Lésions interférant avec l'abreuvement ou la prise de nourriture.

Cette étude nécessite 3 procédures et 360 souris sur 5 ans. Les souris seront des souris portant une mutation sur Gata2, ayant perdu une copie de ce gène ou des souris sauvages qui serviront de contrôle.

15837 Dans son rapport présenté en Février 2017, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) lance l'alerte sur le nombre insuffisant de nouveaux antibiotiques en développement et la menace croissante de la résistance aux antimicrobiens. Elle publie également sa première liste « d'agents pathogènes prioritaires », hautement résistants aux antibiotiques, énumérant les familles de bactéries les plus menaçantes pour la santé humaine. En tête de liste de la catégorie « critique » se trouvent les bactéries du genre *Acinetobacter* spp, et en particulier l'espèce *Acinetobacter baumannii*. C'est un pathogène fréquemment associé aux infections nosocomiales (acquises en milieu hospitalier), telles que les pneumonies sévères acquises sous ventilation chez les patients de réanimation ou immunodéprimés. *Acinetobacter baumannii* est le plus souvent résistant à un grand nombre d'antibiotiques, y compris les carbapénèmes, qui constituent l'une des dernières lignes de traitement actuellement disponible (51% de résistance aux carbapénèmes en 2010 et jusqu'à 80% de résistance dans certains pays européens). De ce fait, les infections à *Acinetobacter baumannii* sont associées à une mortalité hautement significative, à hauteur de 40%.

Par ailleurs, l'OMS met en avant la nécessité de mieux évaluer les antibiotiques dans des modèles précliniques pertinents. C'est dans cette perspective que le projet PulmoCRAB' s'inscrit. L'objectif final de ce projet consiste à mettre au point un modèle préclinique d'infection Pulmonaire aux formes Carbapénèmes-Résistantes d'*Acinetobacter baumannii* (CRAB) chez le lapin. En amont, et afin de sélectionner les souches les plus virulentes nécessaires à la mise en place du modèle lapin, une étape de screening de 30 souches a été réalisée dans un modèle murin de sepsis (projet déjà soumis et validé par le ministère de la recherche et de l'innovation).

Les 3 souches sélectionnées seront évaluées dans un modèle pathologique innovant d'infection pulmonaire à *Acinetobacter baumannii* multi-résistant chez le lapin. Afin de confirmer ce modèle, un traitement antibiotique sera administré aux animaux dans un deuxième temps.

Dans le cadre de cette étude, une attention particulière a été apportée au respect de la règle des 3R

Remplacer réussir à retranscrire la complexité d'une infection bactérienne pulmonaire, ses interactions avec le système immunitaire ainsi que sa diffusion tissulaire et systémique n'est aujourd'hui possible qu'à travers les modèles *in vivo*.

Réduire Un modèle de sepsis à CRAB chez la souris nous a permis de sélectionner les souches les plus adaptées à cette étude. Ainsi, seulement 3 souches de CRAB seront testées chez le lapin et non 30, ce qui réduit considérablement le nombre d'animaux utilisés. De plus, le protocole de cette étude a été construit de manière à ce que les résultats des phases préliminaires valident ou non la poursuite de l'étude. Au total pour cette étude, un maximum de 64 lapins New Zealand sera nécessaire.

Raffiner Les animaux seront hébergés dans un environnement adapté, enrichi et seront surveillés au moins 2 fois par jour. Des critères d'arrêt reposant sur le bien-être des animaux ont également été mis en place.

15838 Les oestrogènes, et en particulier le 17 β -oestradiol (E2) sont des hormones sexuelles qui sont largement impliquées dans le développement de la glande mammaire à la puberté. Or, à l'âge adulte, de par leur rôle sur la prolifération et la différenciation de ce tissu, la détection du récepteur des oestrogènes ER α est un facteur majeur dans le diagnostic des cancers du sein, qui représentent la 1^{ère} cause de mortalité chez la femme. Les patientes qui ont un cancer du sein exprimant le récepteur des oestrogènes ER α sont alors traitées avec des molécules bloquant l'effet des oestrogènes, soit par le Tamoxifène ou inhibiteurs d'aromatase. Or, malgré ces traitements, 40% des patientes récidivent, ce qui nécessite une meilleure compréhension des mécanismes d'action du récepteur des oestrogènes ER α . Ce récepteur ER α existe sous différentes isoformes, à savoir une forme longue de 66kDa, et une forme plus courte en taille de 46kDa. Il a aussi 2 localisations, une dans le noyau des cellules et l'autre à la membrane. Notre projet est donc d'étudier le rôle de ces différentes isoformes du récepteur des oestrogènes ER α , (courte/longue et nucléaire/membranaire) dans la carcinogenèse mammaire, en analysant l'apparition, la croissance de tumeurs mammaires dans des souris génétiquement modifiées exprimant ces différentes isoformes. Les animaux seront suivis de manière hebdomadaire pour comparer l'évolution de la maladie dans les différents modèles. Les tumeurs seront également ré-implantées sur des souris immunodéficientes pour analyser la réponse au traitement ou l'étude de métastases.

Les animaux sont sacrifiés quand une de leur tumeur aura atteint au maximum 17 mm sur son grand axe ou au maximum, quand les souris auront atteint l'âge de 300 jours si aucune tumeur n'est apparue avant. Le nombre de souris engagées par ces expériences est évalué à 1110 souris.

Ce protocole a été pensé en suivant le règle des 3R « Remplacer, Réduire et Raffiner ».

- Nous avons réduit le nombre de souris à 20 animaux par groupe, ce qui nous assure une validation statistique, d'après les différentes revues de la littérature utilisant ce modèle PyMT développant des tumeurs mammaires spontanées. Nous avons 3 groupes par genotype, puisqu'il y a les homozygotes WT, les hétérozygotes + /ER α muté et les homozygotes mutées ER α muté/ER α muté. Les tests statistiques seront réalisés en utilisant le test log-rank pour comparer les survies des populations.

Nous remplaçons dès que possible l'expérimentation animale par des tests en culture de cellules pour l'étude de la réponse au traitement. Mais, il faut noter qu'il n'existe aucun moyen de remplacer de telles études qui englobent l'ensemble de l'organisme dans sa réponse physiopathologique et que seule l'expérimentation animale permet d'étudier un processus de différenciation tumorale et de carcinogenèse, et un suivi complet de la maladie depuis ses phases les plus précoces.

- Nous raffinons les conditions de vie de l'animal en limitant le nombre d'animaux par cage, et en adaptant ce nombre selon leur comportement. Un suivi rigoureux des souris tout au long du protocole est effectué en palpant les glandes mammaires des souris pour analyser l'apparition de tumeur et en mesurant le poids corporel. Le bien-être des animaux sera donc évalué de façon complémentaire et quotidienne en observant leur comportement et les indices pouvant suggérer une douleur (prostration, poil hirsute, score de grimace.). Les changes des cages sont effectués

une fois par semaine ou plus si besoin afin d'avoir une litière propre, et qu'il y ait suffisamment d'eau à boire et d'aliments

15839 Les virus de la famille Paramyxoviridae (Parainfluenza (PIV) et virus respiratoire syncytial (VRS) causent des infections respiratoires chez les personnes âgées, les nourissons (ils sont une des causes principales de leur hospitalisation), les personnes avec des problèmes cardio-vasculaires et les personnes immunodéprimées. Le temps d'incubation de ces virus est de 2-6 jours. Les virus PIV et VRS causent une pneumonie sévère chez les nouveau-nés, se manifestant par une forte fièvre, cyanose, dyspnée et crachat purulent sanglant. Chez les adultes, le virus provoque seulement une inflammation dans les parties supérieures des voies respiratoires (rhinite fiévreuse et laryngite). Les premiers signes sont des maux de têtes soudains, douleurs dans les muscles et articulations, suivis de fièvre de 38-39 °C. Si le tract respiratoire inférieur est impliqué, un enrouement et une toux sèche se développent en signe de trachéobronchite. Quelquefois, les symptômes de méningite se présentent en même temps. Ils peuvent être associés à d'autres infections des voies respiratoires chez les enfants comme la trachéobronchite, la bronchiolite et la bronchopneumonie. Parfois, une maladie légère et non spécifique survient après l'infection.

Ces virus sont répandus dans le monde entier et leur impact économiques commence seulement à être mesuré.

Ils sont sensibles aux détergents et à la chaleur, mais peuvent rester viables sur une surface pour une durée pouvant aller jusqu'à 10 heures. La transmission se produit par voie aérienne, par des aérosols. À l'heure actuelle, il n'existe pas de vaccin, de méthode de prévention ou de traitement standard pour les virus PIV et VRS.

Plusieurs vaccins ont été testés, mais aucun n'a encore atteint l'autorisation de mise sur le marché. Le Ribavarin est utilisé dans certains cas de traitement contre la PIV chez les personnes immunodéprimées mais les résultats ont été variables. Dans ce contexte, avec une insistance croissante de protéger la santé publique et sous la pression des pandémies comme celle de H5N1, il est urgent d'offrir de meilleures options de traitement de la grippe ainsi que la parainfluenza humaine. Pour cela, une dizaine d'inhibiteurs viraux a été étudiée *in vitro* ces travaux ont été couronnés par une inhibition et la non réplication virale de manière reproductible. Désormais ces composés doivent être testés *in vivo* sur un modèle animal relevant.

Ce protocole expérimental est conçu dans un souci de respecter la règle des 3R

Remplacer nous avons sélectionné par des méthodes *in vitro* des inhibiteurs de la réplication des virus PIV et VRS. Nous devons maintenant utiliser des rongeurs sensibles à l'infection (sigmodons et souris) pour évaluer si ces inhibiteurs sont aussi efficaces *in vivo*.

Raffiner par la mise en place de points limites adaptés et d'un score clinique, les animaux seront sacrifiés avant que la maladie ne soit trop grave pour eux.

Réduire Les doses seront établies sur des effectifs restreints, l'effectif complet ne sera atteint que s'il faut répéter certaines expériences pour des raisons de statistiques. Le nombre total est de 247 sigmodons et 94 souris pour un total de 341 animaux.

15840 La néphropathie diabétique est une complication rénale sévère qui touche jusqu'à 50% des patients diabètes de type 1 et 2 au cours de leur vie. La néphropathie diabétique altère progressivement le fonctionnement du rein en réduisant sa capacité à épurer le sang des produits dont le corps n'a pas besoin ou qui sont en excès dans le sang tels que le sodium, potassium, l'urée, l'albumine, le glucose et l'eau. Cette altération est liée à une réduction de la faculté du rein à filtrer le sang; on parle alors de réduction de la filtration glomérulaire du rein. Les symptômes de cette complication incluent notamment une altération du contrôle de la pression artérielle, la présence de protéines dans les urines, une augmentation du besoin d'uriner, une perte d'appétit, des nausées et une fatigue musculaire. Dans ses formes sévères, elle peut évoluer défavorablement vers une insuffisance rénale et un recours à la dialyse, voir à la transplantation rénale. Un bon contrôle de la glycémie est essentiel chez les diabétiques afin de limiter l'apparition et l'évolution de la

néphropathie diabétique. Néanmoins, les options thérapeutiques pour cette complication restent très limitées, voire inexistantes dans les cas avancés.

L'étude décrite dans le présent dossier sera réalisée dans le cadre du développement d'une série de 6 composés destinés à l'amélioration de la néphropathie diabétique. L'objectif de la présente étude sera d'évaluer l'impact d'un traitement chronique à l'aide de ces composés (administration journalière pendant 8 semaines, les composés étant mélangés à la nourriture) sur la prise alimentaire et hydrique (mesurées deux fois par semaine), la prise de poids (mesurées deux fois par semaine), la fatigue musculaire (3 mesures au cours du traitement), le taux de filtration glomérulaire (3 mesures) et la tolérance au glucose (2 mesures). Les traitements seront réalisés chez des souris db/db (7 semaines à la réception), une souche présentant une mutation spontanée sur le récepteur de la leptine qui lui confère un phénotype diabétique (diabète de type 2) et le développement spontané d'une néphropathie diabétique. Un contrôle négatif du modèle sera employé (souris db/m). La présente étude nécessitera l'emploi de 80 souris db/db et 10 souris db/m, réparties en 9 groupes expérimentaux composés de 10 animaux.

La règle des 3Rs a été prise en compte dans l'élaboration du présent protocole

- Raffinement : Le protocole a été planifié de façon à limiter au maximum tout stress et tout inconfort pour les animaux. Les traitements seront administrés par un mélange dans la nourriture, excluant ainsi toute voie d'administration invasive. Les mesures de filtration glomérulaires seront réalisées grâce à un dispositif de mesure transcutanée placé sur le flanc de l'animal. Les animaux seront hébergés en cages ventilées individuelles mais un enrichissement du milieu sera assuré par l'ajout d'igloos et de matériels de nidification et les animaux conserveront des contacts visuels d'une cage à l'autre. Enfin, un suivi journalier des animaux à l'aide d'une grille de score permettra une action rapide en cas d'atteinte des points limites établis.

- Réduction : Le nombre d'animaux utilisés a été rationalisé à partir des données de la littérature, de façon à être en mesure de mettre en évidence une différence statistiquement significative sur les paramètres étudiés.

- Remplacement : L'utilisation d'animaux à des fins scientifiques se justifie ici car il n'existe aucune méthode de substitution n'utilisant pas l'animal de laboratoire et permettant l'étude de l'impact d'un composé sur la néphropathie diabétique. Le modèle animal qui sera utilisé est un modèle largement caractérisé dans la littérature et dont le phénotype a été décrit. Ce modèle s'avère d'intérêt majeur dans le cadre d'études précliniques cherchant à mettre en évidence les effets bénéfiques de composés sur la néphropathie diabétique.

15841 Les études précliniques permettent d'acquérir les premières connaissances sur le comportement d'un candidat médicament, indispensable avant les essais chez l'Homme. Le développement préclinique fait en particulier appel à l'expérimentation animale, qui est une étape indispensable à la connaissance d'un futur médicament avant de l'administrer à l'Homme. En effet, il n'est pas envisageable d'administrer un nouveau composé à l'Homme sain ou malade compte tenu des risques non connus susceptibles d'apparaître. Au cours du développement préclinique, un grand nombre d'études sont effectuées afin de qualifier le candidat médicament sur le plan de la pharmacologie, de la pharmacocinétique ou encore de la toxicologie. Ces études sont constitutives d'une partie du dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché (AMM) du futur médicament.

Avant d'étudier l'efficacité de nouvelles molécules, il est indispensable de déterminer avec précision leur toxicité. Les résultats de ces études permettront de poursuivre par l'analyse de l'efficacité de ces nouveaux traitements à des doses non toxiques.

Pour définir le niveau de toxicité des nouveaux traitements à tester, deux types d'études parallèles seront menées la première avec l'administration d'une dose unique et la deuxième avec l'administration de doses répétées du traitement, permettant de déterminer l'impact aigu et continu à court terme du produit. Pour la procédure en traitement aiguë, jusqu'à six doses du traitement seront administrées à des groupes différents d'animaux selon un arbre décisionnel, la dose suivante étant déterminée en fonction de la dose précédente, dans l'objectif de trouver la dose maximale

tolérée du produit. Pour la procédure avec administration répétée, le produit sera administré avec 3 concentrations différentes (une faible, une intermédiaire et une forte) pour évaluer l'effet de la dose du produit sur les signes cliniques éventuellement observés.

L'administration du produit sera suivie d'une observation très précise et stricte de l'état de l'animal et cela chaque jour sur une période minimale de 14 jours. Si nécessaire, un référent du comité du bien-être des animaux viendra attester de l'état clinique de l'animal au niveau physique, physiologique et comportemental.

Nous estimons que 4620 animaux (3080 souris et 1540 rats) seront nécessaires pour réaliser 30 études pendant une durée de 5 ans.

Les dispositions prises pour l'application de la règle des 3R seront les suivantes

- « Réduire » le nombre d'animaux en expérimentation

Pour nos expérimentations, nous avons prévu le nombre minimal d'animaux, pour garder une puissance statistique dans le traitement des résultats et pour avoir le nombre de contrôles internes suffisant, afin de pouvoir conclure sur la toxicité du traitement.

- « Raffiner » la méthodologie utilisée, ce qui implique la notion de points limites (critères d'interruption, ou "end-points")

Les animaux seront suivis quotidiennement pour pouvoir identifier les signes de souffrance les changements physiques (pelage, peau, yeux...), la mobilité, l'alimentation, l'agressivité, le poids du corps (mesuré 2 fois par semaine) limité à une perte de 20% maximum par rapport au poids initial, la consistance des fèces. Si les signes persistent au bout de 24h, l'animal sera euthanasié.

- « Remplacer » les modèles animaux

Notre projet se focalise sur un modèle d'étude de toxicologie nécessitant l'utilisation d'un modèle animal. Ce système est indispensable pour reproduire la physiologie d'un organisme entier. Il n'existe pas de modèle cellulaire reproduisant nos procédures expérimentales.

15842 Les maladies inflammatoires chroniques de la peau sont des maladies cutanées complexes qui mettent en jeu différentes cellules du système immunitaire. De plus la réponse immunitaire peut être locale (dans la peau) mais aussi à distance (au niveau des nœuds lymphatiques ou ganglions drainant).

L'hypersensibilité de contact est un test *in vivo* simple pour apprécier la fonction immunitaire dans le cas d'une stimulation cutanée. L'exposition de cellules cutanées (de l'épiderme et du derme) à des allergènes de contact entraîne une réaction d'hypersensibilité qui peut être mesurée et quantifiée. L'hypersensibilité de contact se compose de deux phases une phase initiale de sensibilisation et une phase d'excitation ou de rappel. Cette dernière phase se produit lorsque les cellules épidermiques rencontrent un antigène particulier auquel elles ont déjà été exposées, et se caractérise chez les rongeurs par un gonflement localisé et chez les humains par un eczéma de la peau. Ainsi, le modèle murin présenté dans ce projet est un excellent modèle pour étudier les mécanismes impliqués dans la dermatite de contact allergique humaine et pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

Même si l'implication des différentes cellules du système immunitaire est de mieux en mieux connue, l'importance et les mécanismes de leur migration vers le site de l'inflammation et de la sécrétion de cytokines inflammatoires ne sont pas totalement élucidés. Les mécanismes de migration et de sécrétion dépendent de l'état du réseau de tubuline intracellulaire, lui-même contrôlé par les modifications post-traductionnelles de la tubuline.

Le projet présenté ici vise à établir l'implication des enzymes responsables des modifications post-traductionnelles de la tubuline et plus particulièrement les glycyloses et glutamylases dans l'inflammation cutanée.

Le projet se déroulera sur 5ans.

REMPACER Il est possible de regarder les interactions cellulaires *in vitro* en cultivant les cellules immunitaires dans différentes conditions mais de telles expériences ne permettent pas d'avoir une vision globale des interactions dans le temps et dans l'espace des différentes cellules. De plus, il

n'existe pour l'instant aucun modèle *in vitro* qui permettrait d'étudier le dermatite de contact allergique humaine. De même, il n'existe pas d'alternative autre que l'utilisation d'animaux génétiquement modifiés pour évaluer avec précision et pertinence, le rôle physiopathologique des gènes de notre étude dans le dialogue qui peut se mettre en place entre les cellules décrites ci-dessus. Nous utiliserons le modèle souris *mus musculus*, permettant l'inactivation de manière tissu-spécifique et inductible des gènes d'intérêt.

REDUIRE L'étude que nous présentons a déjà été réalisée sur d'autres lignées de souris dans le laboratoire de nos collaborateurs allemands et nous pouvons déjà définir avec précision le nombre de souris suffisant par groupe pour chaque procédure. Ce nombre a été validé par le service de statistique de notre institut pour atteindre une puissance statistique de 80%.

RAFFINER Toutes les dispositions ont été prises pour le raffinement des conditions d'élevage et d'expérimentation. Notamment, il existe au niveau de l'animalerie une structure du bien-être animal (SBEA). Le bien-être animal est évalué quotidiennement. Les procédures expérimentales sont parfaitement définies et ont été publiées et validées par le comité de pilotage de l'animalerie de l'institut. Une attention particulière est portée à la formation de l'expérimentateur afin de limiter la durée de la procédure expérimentale et ainsi réduire la douleur et limiter les variations expérimentales. Une fiche de suivi est établie pour chaque animal de la procédure expérimentale. Cette étude représente l'utilisation de 528 animaux pour 11 lignées de souris.

15843 Un des enjeux majeurs dans la recherche sur la maladie d'Alzheimer (MA) est de diagnostiquer avant la mise en place de dommages irréversibles. Un taux faible du peptide amyloïde β (A β) dans le liquide céphalorachidien (LCR) et élevé dans le cerveau sont des marqueurs très précoces. Cependant le caractère invasif de leur mesure rend leur suivi compliqué et pénible pour le patient. Dans la maladie d'Alzheimer on peut observer un dysfonctionnement entre l'activité cérébrale et le débit sanguin, mais aussi un dysfonctionnement des astrocytes.

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) de diffusion est devenue un outil essentiel pour visualiser l'organisation structurelle du cerveau. Elle est couramment utilisée pour le diagnostic clinique / préclinique de l'ischémie cérébrale. Il s'agit d'un procédé unique pour observer de manière non invasive la structure des tissus par l'intermédiaire de la diffusion des molécules d'eau dans ces tissus.

Lors de l'évolution de la maladie d'Alzheimer, un dysfonctionnement du couplage entre l'activité cérébrale, et le débit sanguin a été identifié au stade de post-symptôme. Donc, l'IRM fonctionnelle (IRMf) sera aussi un marqueur de la MA.

Ce projet vise à établir des marqueurs d'IRMD pour un diagnostic précoce de la MA et un suivi des patients. Le but de ce projet est 1) d'étudier les signaux d'IRMD sur un modèle rongeur quand le canal d'aquaporine est réprimé (TGN-020, inhibiteur d'aquaporine) ou lorsque l'activité d'astrocyte est réprimée (Acide dihydrokainique, l'inhibiteur du transporteur du glutamate) 2) de comparer sur un modèle Alzheimer et un animal témoin les différents signaux d'IRMD, signaux IRMf et l'électrophysiologie lors de l'activité ou du repos des neurones à âge du 3 mois (pré-symptôme) au 12 mois (post-symptôme). Les retombées de ce projet auront un fort impact sur le diagnostic précoce d'Alzheimer par neuro-imagerie pour les hommes, cette pathologie du système nerveux étant une préoccupation croissante en santé publique.

Cette étude n'est pas réalisable par des techniques *in vitro* ou directement chez l'homme car il est nécessaire d'accéder au fonctionnement du cerveau. Dans l'état actuel des connaissances, les modèles *in vitro* ne reproduisent pas la complexité tissulaire, cellulaire et moléculaire d'un cerveau humain.

Ce projet est réalisé sur des animaux de façon à ce qu'aucune angoisse, douleur ou souffrance ne soit ressentie lors des expérimentations. Des protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont donc été définis et validés par une équipe vétérinaire et une observation quotidienne des animaux seront effectuée pour s'assurer de leur bien-être. Dans le cas d'effet inattendu, le vétérinaire de l'installation sera alerté pour mettre en œuvre les traitements appropriés ou de décider de l'euthanasie. Le nombre d'animaux (230) a été réduit au minimum nécessaire pour recueillir un

nombre suffisant de données pour une analyse statistique valide. Chaque test sera pratiqué sur des groupes de 10 animaux

15844 Dans les cellules de mammifères, l'ADN, support de l'information génétique au sein du noyau, est présent sous une forme structurée, la chromatine. C'est la chromatine, et non l'ADN seul, qui est impliquée dans tous les événements moléculaires faisant intervenir le matériel génétique, à savoir la réplication, la transcription, la réparation et la recombinaison. L'organisation de l'ADN en chromatine est donc essentielle et doit être préservée tout particulièrement au cours des divisions cellulaires. Essayer de comprendre la nature et la dynamique de cette organisation a amené à caractériser des facteurs essentiels à sa formation et à son maintien. Les premières "briques" de cette architecture particulière sont des petites protéines compactrices, les histones. Elles forment un cœur protéique autour duquel la molécule d'ADN s'enroule. Ce motif se répète pour former une structure qui ressemble à un collier de perles, la chromatine. Lors de chaque division cellulaire, la cellule fabrique une grande quantité d'histones pour reproduire la chromatine. Une question primordiale est de savoir comment ces histones sont choisies et prises en charge après leur production pour être escortées et délivrées au bon endroit, au bon moment pour construire une architecture spécifique et la reproduire. Des protéines spécialisées, appelées chaperons d'histones, protègent, surveillent et accompagnent les histones tout au long de leur vie. Un des rôles les mieux connus des chaperons d'histones est leur fonction dans l'assemblage de la chromatine.

Notre projet a pour objectif d'évaluer comment les réseaux des chaperons d'histones s'adaptent aux changements physiologique et développemental, entre plasticité et stabilité afin de maintenir l'intégrité de la chromatine. Nous allons étudier l'impact de ces changements à l'échelle d'un organisme vivant entier, la souris, afin de mieux comprendre le rôle des chaperons d'histones dans un contexte physiologique. Nous avons récemment généré des souris génétiquement modifiées pour certains chaperons d'histones, afin de comprendre l'importance de ces protéines dans un organisme vivant, dans un tissu donné et à un stade développemental spécifique.

Toutes les souris génétiquement modifiées utilisées dans ce projet ne présentent pas de phénotype dommageable ni pendant le développement embryonnaire ni à l'âge adulte.

Les interventions sur souris se limitent à des injections intrapéritonéales non douloureuses pour engager la perte des chaperons d'histones concernés. Suite à cette perte, des analyses permettront de définir la fonction/rôle de ces protéines dans un organisme entier, menant à l'analyse d'environ 180 souris pour les 5 ans du projet.

Ce projet est en accord avec la règle des 3R

- Remplacer toutes les études pour comprendre la fonction des chaperons d'histones ont été basées sur des modèles *in vitro* ou cellulaires. L'étape suivante nécessite des expériences *in vivo* pour évaluer la pertinence physiologique de nos découvertes à l'échelle d'un organisme entier, ce qui ne peut pas être obtenu par des méthodes alternatives. La souris a été choisie pour son génome bien caractérisé et sa capacité à générer des souris génétiquement modifiées.

- Réduire). Pour minimiser le nombre d'animaux, des informations seront obtenues aux niveaux phénotypiques, cellulaires et moléculaires à partir du même animal. Ces observations permettront d'identifier une altération d'un ou plusieurs tissus. Elles seront alors poursuivies par l'utilisation de méthodes alternatives (cultures cellulaires appropriées 2D/3D et reconstitution *in vitro* d'organes à partir de cultures cellulaires) qui éviteront l'utilisation d'animaux pour la suite du projet.

- Raffiner les animaux seront suivis quotidiennement afin d'assurer leur bien-être et les expérimentations seront arrêtées avant la souffrance des animaux

15845 L'incidence des maladies rénales chroniques est en progression constante et représente actuellement un problème majeur de santé publique dans les pays industrialisés. Ainsi en France les maladies rénales d'origines diverses touchent plus de 5,7 millions de personnes avec une progression de 2% par an. La maladie rénale chronique est une maladie longtemps silencieuse, d'évolution progressive et qui ne régresse pas. Son évolution, plus ou moins lente, peut aller jusqu'à la perte totale de la fonction rénale. On parle alors d'insuffisance rénale terminale, nécessitant un

traitement de suppléance par dialyse et/ou greffe de rein qui reste lourd de risques et de complications pour les malades. Les mécanismes à l'origine de cette détérioration du rein sont encore peu connus. Leur étude permettrait de ralentir cette évolution en évitant ou en traitant les facteurs qui l'aggravent.

L'utilisation de modèles murins a fourni une aide précieuse dans l'étude de ces phénomènes. Ils nous ont permis d'identifier une molécule, la Lipocaline 2 (Lcn2), comme un médiateur clé du processus lésionnel. Ainsi l'inhibition de la Lcn2 pourrait être une stratégie thérapeutique idéale pour ralentir la progression de la maladie rénale chronique.

D'autre part, la Lcn2 semble jouer un rôle plus large dans la physiopathologie rénale et dans le cancer en général. En effet, une surexpression de Lcn2 est observée dans de nombreux cancers où elle pourrait être impliquée à la fois dans l'évolution du cancer et dans la résistance aux chimiothérapies. Le but de notre projet est donc d'élucider le rôle de la Lcn2 à la fois dans la progression des maladies rénales chroniques et dans le cancer du rein.

Les mécanismes d'action et le rôle de la Lcn2 sont étudiés dans notre laboratoire dans des cultures de cellules rénales mais comme le rein est un organe constitué de plusieurs compartiments, les différents modèles cellulaires ne suffisent pas pour étudier les mécanismes qui conduisent à la régression progressive de la fonction rénale.

Dans un contexte de recherche physiopathologique sur la maladie rénale chronique ou le cancer, les expérimentations *in vivo* ne peuvent en aucun cas être remplacées par des expériences *in vitro*, où les cellules sont sorties de leur environnement. En effet, la maladie rénale chronique est une maladie « systémique ». De plus, les analyses *in vitro* ou *in silico* ne sont pas informatives en ce qui concerne l'étude de la maladie rénale chronique ou du cancer car trop de paramètres physiopathologiques entrent en jeu, d'où la nécessité d'un modèle animal.

Nous disposons de plusieurs modèles de pathologie rénale chez la souris reflétant la variabilité de la maladie rénale humaine l'ablation de tissus rénaux, l'ischémie rénale et la néphropathie médicamenteuse. Ce sont des modèles qui entraînent une altération progressive du tissu rénal. Comme chez l'homme, ces maladies rénales chroniques restent longtemps silencieuses et les animaux seront mis à mort avant l'apparition de symptômes douloureux. L'ablation de tissus rénaux sera appliquée à des souris sensibles à ce modèle et la surexpression observée habituellement de la Lcn2 sera inhibée par l'injection de molécules bloquant sa synthèse. Les 2 autres modèles de maladies rénales seront appliqués à des souris génétiquement modifiées dont le gène Lcn2 a été invalidé. Le rôle de la Lcn2 dans le cancer et la résistance aux chimiothérapies sera étudié en injectant sous la peau de souris des cellules cancéreuses dépourvues ou non de Lcn2. Une chimiothérapie sera ensuite introduite.

Ce projet sur 5 ans utilisera 294 souris. Ce programme de recherche est développé afin de respecter les règles éthiques des 3R :

- 1) Remplacement La culture cellulaire nous permet de tester nos hypothèses mécanistiques mais la complexité du rein et de la maladie rénale nécessite l'utilisation d'un modèle animal.
- 2) Réduction nous utiliserons le nombre minimum d'animaux requis pour obtenir des résultats statistiquement interprétables et atteindre l'objectif scientifique du projet.
- 3) Raffinement La chirurgie sera effectuée sous anesthésie générale avec une prise en charge antalgique. Une surveillance quotidienne sera effectuée auprès des animaux afin de s'assurer de leur bien-être constant en se référant à une grille de points limites. Au moindre de signe de douleur on réalisera une injection supplémentaire d'antalgique, et en cas de dépassement du point limite, on choisira l'euthanasie de l'animal. Les animaux bénéficieront d'un programme d'enrichissement, comme des carrés de cellulose, des bâtonnets de bois, un tunnel ou une maisonnette, défini par la cellule de l'établissement chargée de leur bien-être.

Ces études devraient permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour ralentir la progression de la maladie rénale chronique et retarder voire éviter aux patients la dialyse et la transplantation.

15846 Les reins assurent l'élimination des déchets de l'organisme en assurant la filtration du sang au niveau des structures appelées glomérules. De nombreuses maladies vont toucher les glomérules et entraînent généralement une perte de filtration rénale, conduisant à l'apparition de protéines dans les urines (protéinurie) normalement absentes en cas de bon fonctionnement de l'organe. A l'extrême, cette protéinurie peut elle-même aggraver les lésions rénales et aboutir à la destruction de l'ensemble du rein.

Il existe deux pathologies, appelées hyalinose segmentaire et focale (HSF) et glomérulonéphrite extracapillaire (GNEC) qui, malgré des origines très diverses et différentes, conduisent au même remodelage délétère et à la destruction complète des glomérules. Dans ces deux pathologies, des cellules particulières du glomérule, les podocytes et les cellules pariétales épithéliales, vont se mettre à proliférer et migrer de façon anarchique jusqu'à détruire les glomérules. La conséquence est un risque majeur d'insuffisance rénale terminale à court ou moyen terme et donc ces pathologies sont des urgences médicales absolues.

Nous utiliserons différentes lignées de souris génétiquement modifiées pour étudier les mécanismes de prolifération, migration et de mort des podocytes et cellules pariétales épithéliales au cours des pathologies "glomérulo-prolifératives" chez la souris. Nous cherchons ainsi à valider *in vivo* des cibles thérapeutiques préalablement identifiées par des études *in vitro*, ainsi qu'à identifier de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

Nous utiliserons trois modèles murins des pathologies étudiées : le modèle DOCA-salt, le modèle anti-Thy1.1 et le modèle anti-NTS. Le modèle DOCA salt consiste à implanter sous la peau une pastille délivrant des corticoïdes chez des souris ayant subi une ablation d'un rein afin d'induire une hypertension artérielle qui va provoquer les lésions rénales de type HSF. Le modèle anti-Thy1.1 permet la destruction des podocytes chez des souris par l'injection d'un anticorps et induit également des lésions de type HSF. Le modèle anti-NTS consiste à l'injection d'un sérum néphrotoxique qui va induire une pathologie semblable à la GNEC chez la souris.

La fonction rénale sera suivie tout au long des expériences par des prélèvements d'urines en cages métaboliques. Un prélèvement de sang en intracardiaque sera réalisé juste avant sacrifice pour permettre de réaliser des dosages biochimiques.

L'insuffisance rénale est une maladie complexe et seule l'expérimentation animale, résumant l'ensemble des interactions cellulaires au sein du rein, dans un organisme vivant, permettra d'étudier les mécanismes impliqués dans la protéinurie et la destruction rénale. La souris est un modèle de choix car son architecture et sa physiologie rénale sont proches de celles connues chez l'homme. Nous tirerons parti de la transgénèse, c'est à dire le fait de pouvoir modifier les gènes des souris. Les cibles identifiées grâce aux modèles murins seront étudiées dans des culture cellulaires en parallèle afin d'affiner nos résultats en limitant le nombre d'animaux utilisés.

Ce programme de recherche est développé afin de respecter les règles éthiques des 3R :

- 1) Remplacement La culture cellulaire nous permet de tester nos hypothèses mécanistiques mais la complexité du rein et de la maladie rénale nécessite l'utilisation d'un modèle animal.
- 2) Réduction nous utiliserons le nombre minimum d'animaux requis pour obtenir des résultats statistiquement interprétables et atteindre l'objectif scientifique du projet.
- 3) Raffinement Afin de prévenir au maximum la souffrance et l'angoisse infligée aux animaux, les procédures se dérouleront avec une surveillance régulière et des antalgiques sont prévus en cas de nécessité. Enfin, des points-limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire. Les actes chirurgicaux seront réalisés sous anesthésie générale.

Ce projet s'inscrit sur une durée de 5 ans. Le nombre de souris utilisées sera de maximum 2610

A terme, les résultats de ce projet permettront de mieux comprendre les mécanismes pathologiques de la destruction des glomérules dans l'HSF et la GNEC. Ils pourraient permettre l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques et aboutir à une meilleure prise en charge des patients atteints de ces maladies.

15847 Le cancer colorectal reste la première cause de mortalité non liée au tabagisme et la deuxième cause de décès par cancer. Dans ce contexte où les facteurs cliniques font particulièrement défaut pour rendre compte de l'évolution probable de la tumeur réséquée en particulier pour celles du colon droit, une meilleure compréhension des défauts immunitaires à l'origine d'échappement tumoral permettrait à davantage de patients métastatiques de bénéficier d'options thérapeutiques plus efficaces, comme les immunothérapies. Agissant comme une clef de voûte au succès de ces approches innovantes en immuno-oncologie, la mort cellulaire immunogène est conditionnée par de nombreux mécanismes extrinsèques et intrinsèques à la tumeur qui commencent à être mieux compris. Il est maintenant établi par plusieurs groupes de recherche que le microenvironnement tumoral héberge des populations de macrophages et de cellules dendritiques conventionnelles et dérivées de monocytes qui ont des effets opposés sur l'immunité tumorale.

Dans la continuité de projets antérieurs, notre objectif consiste à développer un schéma expérimental de vaccination préventive ou curative contre le cancer colorectal. Pour cela, notre intention est de mieux comprendre les mécanismes par lesquels les cellules dendritiques participent à l'immunosurveillance en combinant la technologie Cre-Lox à des modèles précliniques de métastase et de tumorigénèse intestinale associée ou non à un contexte d'inflammation chronique. Une meilleure compréhension de ces mécanismes d'immunosurveillance nous permettra d'envisager une optimisation de l'efficacité de ces nouvelles immunothérapies en évaluant avec nos modèles précliniques des combinaisons thérapeutiques.

Sous réserve de résultats prometteurs, les expériences de ce projet impliqueront un maximum de 4640 souris sur une période proposée de 5 ans. Ce nombre maximal d'animaux se justifie par la combinaison des paramètres expérimentaux permettant l'étude des mécanismes d'intérêt. Les procédures expérimentales respecteront les exigences de remplacement, réduction et raffinement. Un suivi strict des souris sera effectué par du personnel formé et habilité. Il est à noter aussi que préalablement aux expériences sur animaux, des études *in vitro* et *in vivo* ont permis de définir les méthodes de raffinement (utilisation de l'endoscopie pour évaluer la progression tumorale et le moment optimal pour l'autopsie) et de réduction (par une analyse multiparamétrique sur chacune des souris).

15848 Le cancer est l'une des principales causes de mortalité dans le monde. Le cancer ORL (otorhinolaryngologique) est la quatrième cause de mortalité en France après le cancer du poumon. La recherche se doit d'être accrue pour pouvoir trouver des traitements efficaces.

La radiothérapie (RT) est le deuxième traitement le plus utilisé pour combattre le cancer après la chirurgie. Les rayonnements ionisants ont toujours été utilisés pour traiter le cancer en tuant les cellules tumorales, en particulier en induisant des dommages à l'ADN. Cette vision de la radiothérapie (RT) en tant que simple agent cytotoxique a radicalement changé ces dernières années, et il est désormais largement accepté que la RT peut profondément réorienter l'environnement tumoral en modulant la réponse immunitaire. De récentes recherches ont démontré que la combinaison de la radiothérapie avec l'immunothérapie permet de régresser la maladie. Par ailleurs de nouvelles cibles thérapeutiques ont vu le jour pour traiter les cancers solides ainsi que les cancers hématologiques.

Malheureusement, on observe des échecs thérapeutiques fréquents causés par la résistance de la tumeur aux anti-checkpoint immunitaires. Mais nous savons que certaines molécules comme l'interféron de type 1 (IFN-1), protéine sécrétée par différents types de cellules immunitaires, est importante pour la réponse à la radiothérapie. Par ailleurs, certaines recherches ont montré qu'augmenter la production de l'interféron de type 1 via la modulation de différentes voies moléculaires permet de favoriser la réponse aux immunothérapies.

Nous proposons une nouvelle approche d'augmentation de la production d'interféron de type 1 via la suppression d'un répresseur transcriptionnel dans un type spécifique de cellule immunitaire qui est recruté après RT. Aucune étude n'ont encore été faite sur l'impact que peut avoir l'inhibition de cette nouvelle cible dans la réponse à la radiothérapie, et à la combinaison RT+ immunothérapie. Etudier ces effets seront une nouvelle piste de traitement pour les cancers ORL et les cancers du poumon. Nous nous attendons à ce que la suppression de ce répresseur transcriptionnel amène à

une augmentation de l'efficacité de la RT, ainsi qu'une amélioration de la réponse aux immunothérapies.

Afin de déterminer l'efficacité de traitement de cette combinaison, seul un modèle *in vivo* pourra nous apporter les informations nécessaires. En effet, le type d'interaction évalué est complexe et inclus le rôle de la radiothérapie sur les différents tissus ciblés du système immunitaire et du microenvironnement tumoral. Il n'existe pas de modèle *in vitro* permettant une telle étude. Le projet nécessite donc d'être mené sur un organisme vivant disposant d'un système immunitaire. Nous avons mis en place des stratégies d'expérimentation et d'observation afin de réduire au minimum la souffrance et la douleur des animaux, qui pourraient résulter des greffes de cellules tumorales aux animaux. Les souris seront hébergées en groupe pour minimiser le stress de l'isolement. De plus, l'environnement des animaux sera enrichi en permanence par du coton ou des nids en carton afin de diminuer leur angoisse et favoriser leur bien-être. Les points limites seront strictement appliqués. Les procédures expérimentales seront faites après anesthésie. Les animaux recevront un aliment riche et appétent de récupération en cas de problème. Le nombre d'animaux sera adapté pour atteindre les objectifs du projet et réduire au minimum le nombre d'animaux. En effet, une analyse statistique *a priori* a été effectuée afin de calculer le nombre d'animaux nécessaires pour détecter des différences significatives tout en réduisant au minimum le nombre d'animaux, qui a été estimé au maximum à 2005 sur 5 ans.

15849 L'objectif de ce projet vise à déterminer l'effet de nouvelles molécules à visée pharmaceutique après modulation de gènes cibles impliqués dans la fibrose hépatique induite par un régime spécifique.

La fibrose hépatique est la conséquence de mécanismes de réparation tissulaire et de réactions inflammatoires chroniques et non résolus. Elle est caractérisée par une augmentation du dépôt de protéines matricielles qui désorganisent l'architecture des organes touchés. La fibrose hépatique est une résultante commune aux pathologies chroniques du foie, qu'elles soient d'origine virale (hépatite C), parasitaire, biliaire, auto-immune ou consécutive à une stéatohépatite (accumulation de graisse dans le foie) alcoolique ou non alcoolique (NASH).

Pour étudier les mécanismes biologiques on a généralement recours aux modèles transgéniques constitutionnels qui surexpriment ou qui sont démunis pour un gène. De tels modèles transgéniques transitoires et spécifiques pour un tissu ou un organe cible peuvent être créés par le transfert de gènes qui seront véhiculés par des particules virales créées en laboratoire. Leur administration aux animaux va permettre de produire de manière temporaire sans effets toxiques ou réaction immunologique, la régulation des gènes choisis chez l'animal.

La fibrose est multifactorielle et se traduit par la dérégulation d'un certain nombre de gènes entraînant la pathologie. Il n'est pas dans l'état actuel des connaissances et des modèles disponibles, possible de procéder à ces évaluations sans avoir recours à un organisme vivant complet et fonctionnel.

Dans notre cas, l'expression des gènes est modulée par infection virale (adeno-associated virus) permettant soit de diminuer, soit d'augmenter l'expression de gènes cibles.

La compréhension de l'effet de la modulation de gènes cibles permet de cibler de façon plus précise des traitements qui pourraient s'avérer efficaces. L'objectif étant de cibler ces gènes dont la modulation est profibrotique, avec des molécules spécifiques afin de traiter la fibrose.

Ce modèle hépato-spécifique sera réalisé au cours de la durée de 5 ans couverte par ce projet avec 1765 souris.

Dans le respect de la règle des 3R, des tests *in vitro* seront réalisés préalablement pour identifier les constructions les plus intéressantes avant l'utilisation dans un modèle murin plus complexe qui est indispensable pour mieux comprendre l'ensemble des mécanismes mis en place.

Pour réduire au maximum le nombre d'animaux nécessaires dans les expériences, un ajustement strict du nombre d'animaux est effectué afin de maximiser les informations recueillies lors de la caractérisation sans mettre en péril une interprétation statistique des résultats.

Dans un souci de raffinement, les procédures réalisées sur les animaux dans ce projet sont d'une gravité modérée, et il n'est pas envisagé que le modèle montre des signes évident de douleur. Cependant dans le cas d'effets indésirables plutôt d'inconfort qui pourraient être observés pendant la période qui suit les injections seront contrecarrés le cas échéant par l'utilisation de dispositifs de chauffage (lampe ou tapis chauffant) pour améliorer la récupération de l'animal pendant la période de récupération.

Les animaux seront sous observation quotidienne. Une surveillance accrue sera pratiquée dans le cas où une dégradation de l'état général des animaux est constatée. De plus, il ne sera effectué sur les animaux que le nombre strict de prélèvements sanguins, en volume et en fréquence, compatibles avec la physiologie de l'animal. Aucun animal en détresse ou en souffrance ne sera maintenu dans cet état, dans le cas où l'animal atteindrait les points limites préalablement défini (dégradation de l'état général, du comportement, une perte de poids rapide et majeure) il serait mis à mort par une méthode humaine adaptée le cas échéant.

15850 L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est devenue un outil puissant pour visualiser de façon non invasive la structure et les fonctions du cerveau chez l'animal et chez l'homme. Des études récentes ont montré que l'activité neuronale, associée à des changements structurels tels que le gonflement cellulaire, entraîne une variation de la diffusivité de la molécule d'eau, elle-même détectable par IRM de diffusion (IRMD). L'association des techniques d'IRM fonctionnelle et de la mesure de la diffusion de l'eau est appelé IRM fonctionnelle de diffusion (IRMfD). En outre, le coefficient de diffusion apparent (CDA), qui peut être calculé à partir du signal d'IRMf, est une mesure directe de la diffusion de l'eau, et donc de l'activation des neurones.

Lors des expériences d'imagerie fonctionnelle sur les animaux modèles (rongeurs ou primates), une anesthésie est nécessaire pour éviter les mouvements ou l'angoisse. Des mécanismes de l'action de l'anesthésie ont été proposés par de nombreux chercheurs. Plusieurs régions du cerveau, telles que le cortex cérébral, le thalamus, l'hypothalamus, le cerveau antérieur basal et le mésencéphale, sont impliquées dans ce processus. Cependant, la région responsable du passage de l'état anesthésié à l'état éveillé n'est pas encore clairement identifiée.

Le but de cette étude est donc d'identifier la région cérébrale liée au réveil après anesthésie. La technique d'IRMfD s'impose pour étudier l'action d'un agent anesthésique sur le cerveau. Après l'acquisition IRM, les régions cérébrales candidates seront identifiées. Dans un deuxième temps, elles seront stimulées par voie électro-mécanique (électrique, thermique et osmotique) chez des animaux anesthésiés pour confirmer qu'elles sont bien impliquées dans le réveil. Deux types d'agents anesthésiques seront utilisés l'isoflurane (anesthésique) et la médétomidine (sédatif).

Aucun dispositif *in vitro* ni modèle informatique ne peut reproduire la complexité du fonctionnement cérébral, en particulier le passage de l'état anesthésié à l'éveil. Ce projet utilisera des rongeurs modèles, nés en captivité dans des élevages agréés. Leur nombre (136) a été réduit au minimum nécessaire pour détecter un effet statistique suffisant. De plus, pour chaque condition, si aucun effet par stimulation électrique, thermique ou osmotique de la région candidate n'est observé sur les 2 premiers animaux étudiés, cette méthode sera retirée de l'étude.

Des critères d'arrêt ont été définis afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. Dans ce cas, le vétérinaire de l'installation sera alerté pour mettre en œuvre un traitement approprié ou décider de l'euthanasie. Les animaux sont hébergés selon les règles en vigueur dans l'animalerie incluant un enrichissement de milieu, fourni aux animaux pour améliorer leur bien-être.

15851 Le syndrome de Wolfram est une maladie génétique neurodégénérative rare liée à un défaut de la protéine wolframine. Elle se caractérise dès l'enfance par des formes de diabète, une surdité, une perte de vision et des signes neurologiques. Ce projet de recherche préclinique vise à caractériser le phénotype comportemental de souris modèles de la pathologie et de tester une thérapie potentiellement efficace. Il s'agit donc de démontrer l'efficacité *in vivo* de molécules dont le mode d'action est connu et qui sont pour certaines déjà testées chez l'homme. Les souris modèles seront testées pour leur mobilité générale, leur mémoire et leur niveau d'anxiété. Des traitements seront effectués pendant une semaine et leurs effets seront examinés sur les altérations

comportementales identifiées (en mobilité, mémoire ou anxiété). Le phénotypage comportemental requiert d'analyser en parallèle mâles et femelles des mêmes portées, mais en accord avec la règle des 3R, le comportement des animaux sera analysé successivement dans différents tests, suivant un protocole minimisant l'impact des tests antérieurs sur les suivants. Nous procéderons à l'enrichissement minimal du milieu, car un enrichissement trop important interagit avec l'étude de la mémoire. Les analyses statistiques adaptées aux données générées permettront de limiter le nombre d'animaux par groupe. Le projet utilisera 240 animaux une cohorte de 60 animaux sera utilisée pour le phénotypage et 180 souris pour la partie pharmacologique. Le comportement des animaux sera analysé sur des tests classiques en neuropharmacologie comportementale, qui n'induisent pas de stress particulier (activité générale alternance spontanée reconnaissance d'objets apprentissage spatial en piscine tests d'anxiété). Les molécules seront injectées par voie intraperitonéale (100µl/20g) selon les pratiques courantes en soin vétérinaire. Les animaux seront suivis quotidiennement pendant la phase de test. Ils seront ensuite sacrifiés et leur cerveau analysé pour des études moléculaires ou neuroanatomiques a posteriori.

15852 Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) représentent la seconde cause de mortalité dans le monde et la première cause d'handicap. Ces AVC peuvent être ischémiques (causés par un thrombus bloquant un artère) ou hémorragiques et ne peuvent être distingués uniquement sur la base des symptômes du patient. Une imagerie diagnostique doit être réalisée avant toute décision thérapeutique, puisque le traitement diffère fortement entre les deux formes principales d'AVC. De plus, cette démarche doit être effectuée rapidement puisqu'en moyenne une victime d'AVC perd 2 millions de neurones par minute. L'imagerie par Résonance Magnétique (IRM) et la tomographie X (CT) sont utilisées en routine clinique. Malgré leurs immenses avantages, ces deux technologies ne sont pas accessibles suffisamment rapidement partout dans le monde.

L'échographie est une technologie très flexible et portable. Malheureusement, sa résolution est insuffisante lorsqu'utilisée à travers la paroi du crâne puisque les fréquences ultrasonores exploitées doivent être abaissées (autour de 1-2 MHz). Nous avons récemment démontré que l'échographie super-résolue, par microscopie à localisation ultrasonore (ULM), permet de contourner cette limite et nous permettrait de réaliser une angiographie avec une résolution d'environ 50 micromètres à travers le crâne. Nous développons un système d'imagerie ultrasonore innovant pouvant réaliser des images à 50µm de résolution en 3 dimensions, le but ultime étant de transférer cet appareil dans les cliniques et les ambulances, au plus près du patient. Pour mettre au point cet appareil nous devons d'abord valider les méthodes d'imagerie développées, puis ensuite vérifier qu'ils permettent de discriminer les AVC ischémiques des AVC hémorragiques dans des modèles animaux d'AVC.

Le but de ce projet expérimental est de mettre au point la technique d'imagerie chez le rat sain pour ensuite l'appliquer dans des modèles Rats d'AVC (projet séparé car mené dans un autre centre), permettant à terme de distinguer les AVC ischémiques et hémorragiques par des échographies super-résolues du cerveau de rat. La présente demande concerne donc uniquement la mise au point de cette méthode d'imagerie ultrasonore *in vivo* sur le rat.

Pour ce faire, le projet nécessitera l'étude de 20 rats Sprague-Dawley adulte (8 à 12 semaines) sur 3ans. En effet, il nous est impossible de remplacer l'animal car nous avons besoin d'un système biologique intègre pour étudier le réseau vasculaire cérébral et de l'impact des AVC. Le nombre d'animaux a été réduit au minimum en se basant notamment sur l'expérience acquise par l'équipe dans des projets précédents. En outre, les mises au point technologiques ont été développées au maximum dans plusieurs modèles *in vitro*.

Enfin, la procédure sera réalisée sous anesthésie générale associée à une analgésie adéquate afin d'abolir toute douleur et souffrance animale. Des points limites ont été établis entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

15853 De nos jours, l'obésité est devenue une vraie épidémie et entraîne de graves problèmes de santé et économiques. Malheureusement, peu de traitements existent pour traiter cette maladie. L'obésité est une maladie complexe dont les facteurs déclenchants ne sont pas tous et/ou mal connus. La

surcharge calorique fait partie des causes de l'obésité. C'est pourquoi il est déterminant de mieux comprendre comment notre organisme répond à une surcharge calorique pour élaborer de nouveaux traitements. Lorsque l'alimentation devient plus grasse et plus sucrée, notre organisme met naturellement en place des réponses métaboliques et comportementales adaptées pour maintenir le poids corporel stable. Mais alors que se passe-t-il pour que le système « déraile » et survienne l'obésité ? Nous nous intéressons aux perturbations qui apparaissent dans une région du cerveau, l'hypothalamus, qui contrôle normalement la régulation du poids corporel. Un régime trop riche en calories perturbe très tôt l'activité des neurones hypothalamiques, ce qui peut conduire à terme à l'obésité cette première étape s'appelle la neuroinflammation. Il existe d'autres cellules cérébrales, les cellules gliales (astrocytes et microglie), qui aident normalement les neurones à fonctionner correctement. Cependant, ces cellules gliales pourraient, elles aussi, participer au développement de la neuroinflammation hypothalamique. Elles pourraient donc être à l'origine des altérations qui conduisent à l'obésité. Dans ce projet, nous voulons comprendre quelles cellules gliales en particulier et quelle(s) signalisation(s) cellulaire(s) sont impliquées dans l'inflammation et les altérations de fonctionnement de l'hypothalamus. Pour cette étude, nous allons utiliser des approches pharmacologique et génétique (utilisation d'animaux transgéniques). Nous réaliserons des tests comportementaux (prise alimentaire) et métaboliques, des études moléculaires à partir des cellules cérébrales isolées, mais aussi l'analyse par microscopie (*in vivo* et *ex vivo*) des cerveaux des animaux.

Nous prévoyons d'utiliser un maximum de 1356 souris mâles adultes, car ce projet sera réalisé pendant 5 ans. La règle des 3R a été mise en place dans la conception de notre projet et une planification précise des expériences a été établie afin de réduire au maximum le nombre d'animaux inclus dans cette étude, tout en ayant des groupes suffisamment importants pour obtenir des statistiques solides.

La souris représente un modèle de choix pour notre projet par la possibilité d'étudier des individus génétiquement modifiés et dont la physiologie générale est suffisamment proche de celle de l'être humain pour que les informations obtenues soient pertinentes sur un plan médical. De plus, les mécanismes biologiques que nous étudions impliquent une communication bidirectionnelle entre le cerveau et le reste de l'organisme, que ce soit pour la régulation de l'appétit, de la glycémie (taux de sucre dans le sang) ou encore le stockage de graisses. Ainsi, il est absolument nécessaire d'étudier un organisme entier et aucune méthode *in vitro* ou *in silico* ne peut le remplacer (Remplacement).

Nous avons optimisé les protocoles afin de réduire au maximum le nombre de souris utilisées des tests de puissance statistique ont été employés pour calculer le plus petit nombre d'animaux par groupe nécessaire à l'obtention de résultats statistiquement exploitables. En plus, ce chiffre comprend un petit nombre d'animaux utilisés pour des études préliminaires (pilotes), afin d'optimiser une technique de chirurgie et les doses optimales des composés administrés pendant la procédure, ce qui permettra de diminuer la quantité d'animaux utilisés à long terme. Tous les efforts seront faits pour réduire le nombre et la souffrance des animaux utilisés afin d'éviter les répétitions inutiles (Réduction).

En vue du raffinement des procédures, un soin particulier est apporté aux questions relatives au bien-être animal. Le suivi précis du poids et de la prise alimentaire de chaque souris nécessite un isolement de l'animal. Ainsi, les souris sont hébergées en cages individuelles dans une pièce dédiée, avec régulation de la température, de l'humidité et de la luminosité. Le manque d'interactions sociales est compensé par un enrichissement des cages. En outre, les cages, transparentes, sont rapprochées les unes des autres afin que chaque animal puisse avoir un contact visuel avec ses congénères. Avant les expériences, les animaux sont manipulés fréquemment afin de les habituer aux expérimentateurs et réduire ainsi leur stress. Ils seront surveillés quotidiennement par des personnels compétents et formés. Les douleurs consécutives à la chirurgie seront soulagées à l'aide des molécules les plus adaptées au protocole et à l'état des animaux. Des points limites suffisamment prédictifs sont définis pour limiter la souffrance tout au long de la vie de l'animal. En cas de souffrance ou de détresse persistante, les animaux seront mis à mort dans des conditions qui évitent souffrance et stress.

L'ensemble des procédures proposées est en conformité avec les directives européennes 2010/63/UE et françaises, dans le respect des nouveaux standards de soin et de bien-être des animaux.

15854 Les objectifs de ce projet sont d'approfondir notre connaissance des mécanismes de stress cellulaire impliqués au cours de l'hépatite aiguë et d'évaluer une nouvelle stratégie thérapeutique. Pour cela, nous évaluerons différents paramètres dans un modèle murin d'hépatite aiguë.

L'hépatite aiguë induit une inflammation associée à une nécrose plus ou moins étendue des cellules du foie. Un des processus responsables de la nécrose cellulaire s'appelle la transition de perméabilité mitochondriale (ou mPT) qui est régulée par une protéine spécifique la cyclophiline D. L'inhibition du mPTP constitue donc une stratégie intéressante pour la protection cellulaire par l'utilisation d'une nouvelle famille d'inhibiteur de cyclophiline développée dans notre laboratoire.

Dans ce projet, nous proposons d'induire une hépatite aiguë chez la souris par une injection unique de tétrachlorure de carbone (CCl₄) qui est un des modèles les plus couramment utilisés pour induire une hépatite aiguë. Le foie et le sang seront prélevés à différents temps (2, 4, 6, 24, 48 et 72 heures) après le traitement CCl₄ pour étudier différents paramètres la réponse précoce au stress cellulaire, la mort cellulaire, l'inflammation et les mécanismes précoces de la fibrogenèse. Certains animaux recevront le diluant du CCl₄ (groupe contrôle), certains animaux recevront un inhibiteur de cyclophilines afin d'évaluer sa capacité à protéger de l'hépatite aiguë (groupe traité). Le nombre de souris engagées dans ces expériences est évalué à 1184 sur 5 ans.

Ce protocole a été pensé en suivant la règle des 3 R « Remplacer, Réduire, Raffiner »

- Le nombre de souris a été réduit à celui requis pour obtenir une validation statistique des résultats.

- Nous n'attendons pas de souffrance particulière chez les souris soumises à ce protocole. En effet, nous n'avons observé aucune souffrance ou mortalité des souris lors de précédents protocoles utilisant ce modèle au laboratoire. L'hépatite est d'ailleurs asymptomatique chez le patient et est souvent découverte de manière fortuite lors d'un bilan sanguin. Nous effectuerons néanmoins un suivi quotidien des souris tout au long du protocole en observant leur comportement et les indices pouvant suggérer une douleur. Si nous observons une douleur chez un animal, cela entraînerait son euthanasie anticipée. Par ailleurs, les animaux sont hébergés en présence de papier kraft et de carrées de coton pour faire le nid, ainsi que des maisonnettes et des dômes en cellulose.

- Nous avons recours à des animaux car il n'y a pas de méthodes alternatives. En effet, il n'existe aucun moyen de remplacer une telle étude dans laquelle la réponse physiopathologique étudiée met en jeu plusieurs types cellulaires (hépatocytes, cellules immunitaires, cellules fibrogéniques).

15855 Parmi les axes de recherche actuels de traitements ciblant le cancer, l'utilisation d'anticorps autrement appelée immunothérapie est porteuse de nombreux espoirs car elle présente une efficacité marquée sur certains types de tumeurs.

L'un de nos partenaires développe actuellement de nouveaux candidats médicaments de ce type. Ce projet s'inscrit dans le domaine de la recherche préclinique et vise à nous permettre de valider ces traitements sur des modèles animaux afin de prouver leur efficacité avant la phase clinique.

Ce projet est la continuité d'un projet précédent ayant révélé des candidats médicaments intéressants mais en utilisant une voie d'administration différente. Celui-ci nous a par ailleurs apporté une bonne connaissance des modèles tumoraux dans le modèle animal choisi la Souris.

Dans le cadre de ce projet, nous injecterons des cellules tumorales afin de mettre en place des tumeurs de manière contrôlée et reproductible. Les cellules tumorales seront injectées par voie intraveineuse au niveau de la queue (modèle pulmonaire) ou par voie sous-cutanée.

Avant ou après cette greffe, nous injecterons les candidats médicaments pour tester leurs capacités à contrer la croissance tumorale ou à réduire les tumeurs déjà présentes. Par ailleurs, nous ajouterons durant le protocole des composés inactivant certains mécanismes immunitaires afin de comprendre leur implication dans les réponses thérapeutiques observées.

Nous procéderons par étapes successives afin de tester des différents composés qui seront mis en place et optimisés selon les résultats de chaque protocole, durant toute la durée de ce programme de recherche.

Afin d'optimiser les protocoles et de réduire le nombre d'animaux, nous tenterons autant que possible techniquement de mutualiser les groupes contrôles pour tester chacun des candidats médicaments.

REMPACEMENT Dans le cadre de la recherche de composés médicaments sur des pathologies complexes tels que le cancer, nous n'avons pas d'alternative actuellement disponible pour valider les effets des traitements sur des tumeurs, notamment lorsque ceux-ci fonctionnent en synergie avec le système immunitaire.

REDUCTION Nous avons pu établir à l'aide d'études de puissance que 17 animaux expérimentaux par condition étaient nécessaires pour pouvoir obtenir les effectifs suffisants pour conclure. Cela inclut notamment les animaux qui reçoivent une greffe de cellules qui ne mènent pas à une tumeur. Chaque protocole utilisera un maximum de 136 animaux.

Nous prévoyons de réaliser 10 protocoles de ce type par an, soit un total annuel de 1360 animaux expérimentaux au maximum, constituant un effectif théorique de cette autorisation à 6800 animaux sur 5 ans. Il est bien évident que tous les efforts seront entrepris pour réduire autant que possible le nombre d'animaux finalement utilisé.

RAFFINEMENT toutes les dispositions seront prises pour limiter la souffrance des animaux et maximiser leur bien-être. Il s'agit principalement de mettre en place des points limites éthiques permettant de retirer les animaux du protocole avant qu'une souffrance ne soit présente. Nous disposons d'une bonne maîtrise des modèles tumoraux prévus que nous avons déjà utilisé durant plusieurs années dans le cadre du projet précédent.

Ainsi, pour les tumeurs pulmonaires, l'état de santé (état du pelage, posture, activité) et le poids des animaux constituent des indicateurs pertinents pour définir l'efficacité de ces traitements ainsi que l'éventuel impact sur le bien-être des animaux.

Pour le modèle sous-cutané, nous mesurerons aussi le volume des tumeurs 3 fois par semaine, ce qui constituera un point limite spécifique.

Les animaux seront observés quotidiennement pour s'assurer que leur état de santé n'est pas détérioré, et ils seront pesés 3 fois par semaine. Ce paramètre permet en effet sur le modèle Souris de déterminer que les animaux se portent bien.

- 15856** • Buts du projet : Le but de ce projet est de réaliser des modèles murins de carcinomes hépatocellulaires et d'hépatoblastomes (tumeurs malignes du foie) pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans le développement de ces tumeurs, et mettre en place des essais thérapeutiques précliniques chez la souris qui permettront de valider de nouvelles thérapies et des facteurs prédictifs de leur efficacité. Conformément aux nouvelles réglementations, les différentes procédures expérimentales ont été conçues dans le respect de la règle des 3R : 1) Remplacer : les expériences ont été choisies sur la base de résultats expérimentaux préalablement obtenus dans des modèles *in vitro* 2) Réduire : le nombre d'animaux nécessaires aux différentes procédures a été estimé au minimum mais de manière à garantir l'obtention de résultats statistiquement exploitables. De plus, nous utilisons des lots d'animaux homogènes hébergés dans une animalerie EOPS, en cage avec couvercles filtrants avec un change hebdomadaire assuré par les animaliers de l'EU, ce qui permet de limiter les causes de variabilité expérimentales 3) Raffiner : nous avons définis des points-limites d'expérimentation à partir desquels les expériences seront interrompues pour veiller au bien-être des animaux. Les animaux manifestant des signes cliniques de souffrance seront euthanasiés selon la méthode réglementaire. Pour les procédures susceptibles d'engendrer une douleur, les animaux seront anesthésiés. De plus, pour favoriser le bien-être des animaux, nous utilisons des méthodes d'enrichissement du milieu : nids végétaux, maison suspendue à la grille de la cage, petits morceaux de bois, igloos ou tunnels.

- Description et justification du modèle animal utilisé : Nous envisageons de développer deux types de modèles : 1) des modèles de souris génétiquement modifiées mimant les altérations génétiques identifiées dans les tumeurs humaines pour mieux comprendre le rôle de ces altérations dans les différentes étapes du développement de la maladie 2) des modèles de xénotreffes de lignées cellulaires cancéreuses humaines sauvages ou génétiquement modifiées et des xénotreffes de tumeurs directement dérivées de pièces opératoires de patients qui représentent actuellement les modèles les plus pertinents pour étudier la réponse thérapeutique et les facteurs moléculaires qui influencent cette réponse. Ce projet impliquera au total 2132 animaux.
- Contributions potentielles de cette étude à la biologie et à la médecine humaine et animale Ce projet de recherche devrait permettre de mieux comprendre les mécanismes de coopération entre oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs spécifiques dans l'induction de tumeurs malignes du foie chez l'adulte et l'enfant mais aussi de valider de nouvelles thérapies, et des facteurs moléculaires prédictifs de leur efficacité. Ces connaissances permettront de mieux orienter les essais cliniques chez l'homme en facilitant la sélection de sous-groupes de patients susceptibles de répondre à un médicament spécifique.

15857 L'utilisation de modèles animaux en plateau d'élevage et d'exploration fonctionnelle nécessite une maîtrise du statut sanitaire des animaux hébergés. En effet, il est important de connaître l'environnement sanitaire et notamment la présence ou non de pathogènes ou opportunistes. Ces agents infectieux i) peuvent être zoonotiques et donc infecter les manipulateurs ii) agissent négativement sur l'état de santé des animaux pour impacter les conditions d'élevages iii) peuvent interférer avec les résultats expérimentaux. On comprend bien qu'une mauvaise gestion et évaluation de l'environnement sanitaire peut avoir des conséquences désastreuses dans les animaleries et pour la fiabilité des recherches scientifiques. Un programme de contrôles doit donc être mis en place selon des recommandations précises fournies au niveau Européen. Un plan de contrôle sanitaire efficace permet de répondre au 3R en élevage car

- L'identification des agents présents permet une meilleure anticipation et adaptation à l'élevage et l'expérimentation
- Avec des animaux en bonne santé la productivité est optimisée,
- Les résultats expérimentaux sont plus robustes

Tout ceci permet un cercle vertueux qui aboutit à une réduction au final des animaux dans les centres zootechniques pour une recherche scientifique plus fiable.

Notre plan de contrôle sanitaire est basé sur la mise en place d'animaux « sentinelles » qui reçoivent les litières sales des autres cages de la pièce. Tous les trimestres, soit ces sentinelles sont envoyées en laboratoire pour identifier les agents soit des prélèvements sont effectués sur ces sentinelles. L'objet de cette demande est la réalisation de ces prélèvements qui sont des prises de sang (quelques microlitres) et des écouvillonnages sur différentes parties de l'animale (bouche, corps et périanales). Ces prélèvements se feront dans le respect de la règle des 3R

- Réduction le plan de contrôle sanitaire par l'utilisation de souris/rats « sentinelles » permet de restreindre à 2 souris par pièce pour évaluer efficacement le statut sanitaire de la zone.
- Raffinement tout d'abord, l'envoi de prélèvements effectués sur le plateau en remplacement de l'envoi des animaux constitue un raffinement en évitant le stress et incidents possibles d'un transport d'animaux. Ensuite, Les méthode d'écouvillonnage et de prises de sang sont très peu douloureux d'autant plus qu'ils sont réalisés par des zootechniciens expérimentés et entraînés pour ces gestes. Toutefois, en cas de mauvais prélèvement ou l'observation de la dégradation de l'animal après les prélèvements, un programme de suivi par grille de score et avec des points limites débutent pour rapidement prendre en charge l'animal en souffrance. S'agissant uniquement de prélèvements simples les critères sont assez généraux (état général, comportement et perte de poids par exemple) pour une prise en charge allant de la désinfection d'une plaie, l'utilisation d'analgésique, à la mise à mort de l'animal.
- Remplacement dans nos conditions, il n'est pas possible de complètement remplacer l'utilisation d'animaux pour les contrôles sanitaires. Ceci dit, quand cela est possible, nous utilisons des

systèmes de filtres qui récupèrent les poussières des zones d'hébergement. Ces filtres, qui permettent de récupérer et concentrer les agents infectieux présents, seront analysés à la place des sentinelles à chaque fois que cela est possible.

Le plan de contrôle sanitaire concerne la zone « rongeurs » de notre plateau et il sera utilisé au maximum 1050 souris et 45 rats pour les prélèvements (1095 animaux).

15858 Notre projet s'intéresse aux nouvelles technologies et techniques chirurgicales d'assistance (tissulaire et/ou mécanique) et de réparation de l'insuffisance cardiaque post-infarctus. Il s'agit d'un axe de recherche et de développement très actuel et en phase avec un besoin important à la fois en compréhension fondamentale et en application clinique humaine.

Notre équipe souhaite explorer une piste peu connue du domaine des assistances cardiaques nommée Compression Cardiaque Directe (Direct Cardiac Compression en anglais ou DCC). Le concept des DCC consiste à appliquer un effort sur la paroi externe du cœur grâce à un exosquelette afin d'améliorer l'éjection du sang par ce dernier et ainsi de restaurer le débit cardiaque.

La première étape, et l'objet de cette saisine, est le test d'une bio-membrane interface nécessaire entre le cœur et l'exosquelette.

Des études préliminaires ont montré la biocompatibilité des constituants de cette membrane mais il est indispensable maintenant de passer à l'étape de validation chez l'animal en situation physiologie (remplacement).

38 rats mâles wistar seront répartis en 2 groupes 1 groupe de rats témoins + un groupe de rats avec infarctus (par ligature de l'artère coronaire). La bio-membrane sera greffée chez tous les animaux. Un contrôle de la fonction cardiaque sera réalisé au moyen d'une imagerie TEP. Ces opérations seront réalisées sous anesthésie générale. A la fin des procédures, une overdose d'anesthésiant entraînera la mort de l'animal sans souffrance avant de réaliser des prélèvements d'organes en vue d'analyses histologiques.

Nous avons établi des points limites (modification des paramètres cardiaques et respiratoires indiquant un réveil, une douleur ou un inconfort de l'animal durant l'opération chirurgicale mais aussi comportement inadéquat, modifications physiques pendant toute l'étude) qui ne seront pas dépassés grâce aux procédures médicamenteuses disponibles au laboratoire (analgésie, anesthésie chirurgicale) ou à une prise en charge suffisamment précoce.

Ce modèle est déjà en place dans notre structure permettant de réduire le nombre d'animaux. Ainsi, 38 rats sont nécessaires permettant ainsi une étude statistiquement exploitable.

Les conditions d'hébergement (enrichissement du milieu), de soins (établissement de points limites) et surtout les méthodes utilisées (opérations sous anesthésie générale, analgésie contrôlée) qui sont des méthodes dérivées directement de la pratique clinique chez l'homme permettent ainsi un raffinement de la méthodologie.

15859 L'asthme est une maladie très fréquente des voies respiratoires qui touche 300 millions personnes dans le monde. Le terme « d'asthme sévère » s'applique aux patients présentant un asthme dont le contrôle est impossible malgré des traitements inhalés à fortes doses.

Un aspect des traitements de l'asthme sévère consiste en la prévention efficace des exacerbations. Ces exacerbations sont des épisodes caractérisés par une majoration des symptômes d'essoufflement, de toux, de respiration sifflante ou de douleur thoracique et par une diminution de la fonction respiratoire.

L'asthme est caractérisé par une hyperréactivité, une inflammation et un remodelage bronchique. La modification de la structure de voies aériennes, que l'on désigne remodelage bronchique, se traduit notamment par une augmentation de la taille du muscle lisse bronchique.

A son tour, la hausse de la taille du muscle lisse bronchique est associée à une fonction respiratoire dégradée et à un taux d'exacerbation plus élevé. Une des caractéristiques majeures du muscle lisse bronchique d'une personne asthmatique est l'excès de prolifération cellulaire, démontrée *in vitro* et

in vivo. Cependant, les mécanismes d'un tel remodelage restent inconnus. Il a été démontré un lien entre la taille du muscle lisse bronchique et l'augmentation de la masse mitochondriale. L'augmentation de la biogenèse mitochondriale permet ainsi la prolifération accrue des cellules de muscle lisse bronchique. Ce phénomène indique un dysfonctionnement mitochondrial au sein de ces cellules chez les patients asthmatiques.

Une des principales voies d'étude de ce dysfonctionnement mitochondrial passe par la régulation d'un gène appelé TFAM. La modulation de l'expression de ce gène permet d'évaluer les conséquences au niveau du remodelage bronchique chez l'animal transgénique. Le projet a donc pour objectif d'étudier le remodelage bronchique chez des souris transgéniques afin de déterminer les mécanismes du dysfonctionnement dans l'objectif de mettre en place de nouvelles thérapies de l'asthme.

Dans notre projet, nous accordons la plus grande importance au respect de la règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer). Les mesures mises en place sont les suivantes

1) Réduire se souciant de réduire le nombre des animaux en expérimentation, nous avons calculé le nombre de souris minimal par groupe pour obtenir des résultats significatifs, et nous réaliserons de multiples études *ex vivo* (15 souris seront incluses dans ce projet).

2) Raffiner pour diminuer la souffrance et l'angoisse des animaux, des dispositifs sont prévus, notamment l'enrichissement du milieu et des conditions d'hébergement (hébergement collectif, mise à disposition de objets...) ainsi que le suivi des points limites selon des critères adaptés au projet (critères de perte de poids, comportement anormal ou difficulté respiratoire).

3) Remplacer en raison de la complexité de la communication intercellulaire menant à la maladie, il n'existe pas de modèle *in vitro* qui permet d'estimer l'évolution du remodelage bronchique dans l'asthme suite au blocage du gène clé de la biogenèse mitochondriale. L'utilisation du modèle d'asthme chronique murin dans nos études nous donnera une meilleure compréhension des phénomènes, ainsi le modèle animal ne peut être remplacé.

15860 Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est la 3ème cause de mort par cancer dans le monde et le seul cancer à ne pas avoir régressé ces dernières années. Le CHC représente un problème majeur de santé publique pour lequel les options thérapeutiques sont limitées bien que les tumeurs à un stade précoce puissent être traitées de façon curative en utilisant des approches chirurgicales, elles sont souvent diagnostiquées à un stade avancé non traitable. Ainsi, une thérapie qui soit bien tolérée, peu coûteuse et qui présente un ratio bénéfice-risque acceptable fait défaut.

Récemment, nous avons développé un anticorps dirigé contre la protéine Claudine-1 (CLDN1). Cet anticorps anti-CLDN1 n'a montré aucune toxicité et s'est montré très efficace pour ralentir la croissance de tumeurs dans un modèle de cancer du foie chez la souris. Afin de valider ces résultats, nous souhaitons tester cet anticorps dans des modèles de souris greffées avec des cellules de CHC humain. L'injection de l'anticorps anti-CLDN1 nous permettra de vérifier son potentiel thérapeutique sur le CHC humain. De plus le potentiel thérapeutique de cet anticorps sera comparé à la seule molécule montrant une efficacité significative pour le traitement de certains CHC, le Sorafenib, molécule déjà utilisée chez les patients pour cette même indication. Une combinaison de ces deux molécules sera également testée afin d'identifier un possible effet additif.

La présente demande d'autorisation concerne l'utilisation de modèles humanisés de CHC, basés sur la greffe de cellules tumorales humaines dans des souris dépourvues de système immunitaire. Après validation de la croissance tumorale, un traitement avec l'anticorps anti-CLDN1, avec le Sorafenib, ou la combinaison des 2 sera effectué pour évaluer l'efficacité sur ces modèles.

L'expérimentation animale est nécessaire pour évaluer l'efficacité de cet anticorps sur une tumeur vascularisée humaine, impossible à reproduire *in vitro*.

Le taux de prise de greffe pour des tumeurs issues de patients étant relativement faible (20-30%), le nombre d'animaux nécessaire est estimé à 250, afin de pouvoir tester les tumeurs d'au moins deux patients différents.

Remplacer une majorité des expériences ont été menées en amont, *in vitro* sur des lignées cellulaires et ex vivo sur des biopsies de patients atteints de CHC, *in vivo* dans d'autres modèles murins de maladies hépatiques afin de nous assurer de la réelle nécessité de poursuivre sur ces modèles animaux greffés avec des tumeurs de patients.

Réduire nous nous basons sur la littérature et sur notre expérience en interne afin de n'utiliser que le nombre d'animaux jugé nécessaire à l'obtention de résultats exploitables.

Raffiner le protocole expérimental est planifié en amont, le programme chirurgical nous est communiqué une semaine à l'avance afin de sélectionner les animaux qui seront greffés, l'environnement des animaux est enrichi, les souris greffées auront un suivi quotidien adapté afin d'éviter toute souffrance liée au développement des tumeurs (anti-douleur systématique) et tous les moyens nécessaires seront mis en œuvre pour éviter tout stress ou douleurs lors des procédures (anesthésie, analgésie), si besoin un analgésique dont la durée d'action s'étend au-delà de 24h est utilisé, des points limites que sont la plus grande taille de la tumeur de 20mm, le volume tumoral de 2000mm³, l'ulcération cutanée l'apparition de signes de mal être et de douleur, persistant au-delà de 48h suite à l'injection d'un analgésique sont appliqués et une méthode de mise à mort appropriée est utilisée.

15861 L'arrêté du 1er février 2013 relatif à l'acquisition et à la validation des compétences des personnels des établissements utilisateurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques, impose que les personnels exerçant les fonctions suivantes doivent en avoir acquis la compétence suite à une formation spécifique 1° conception ou réalisation de procédures expérimentales 2° application de procédures expérimentales aux animaux 3° soins aux animaux.

Notre projet est donc éducatif et requis par la loi. Il consiste à former les personnels désignés au 1, 2 et 3 ci-dessus, à la pratique de procédures expérimentales faiblement invasives sur des rongeurs souris et rats

Il s'agit d'initier ces personnels aux techniques suivantes

- préhension, contention, manipulation adaptées aux différentes procédures de routine
- administration et prélèvements faiblement invasifs
- anesthésie
- procédures expérimentales permettant de limiter le nombre d'animaux grâce au suivi longitudinal que permet l'imagerie du petit animal
- pratiquer différentes techniques d'études sur animaux vigils (tests comportementaux, mesures de constantes biologiques non invasives, ...)
- mise à mort

Les travaux pratiques seront précédés de cours théoriques où les avantages et inconvénients de chaque méthode seront discutés. Sur le principe de "jamais la première fois sur l'animal", les TP débutent par une approche sur des modèles en silicone de rat et de souris avant de passer à l'animal. De façon à réduire au minimum le nombre d'animaux utilisés pour ce projet, et de conserver une pertinence pédagogique, les TP sont réalisés en binôme.

De façon à prévenir toute douleur, souffrance et angoisse des animaux, la taille des groupes de formation sera réduite à 4 personnes par formateur et toutes les procédures d'administration ou de prélèvement seront réalisées après anesthésie générale afin de préserver le bien-être des animaux. Les animaux sont stabulés dans l'animalerie au minimum une semaine avant le début de la procédure. Un enrichissement est utilisé dans les cages (dômes ou tunnel) et la présence de 4 animaux par cage est appliquée afin de réduire l'anxiété et le stress des animaux. Une surveillance quotidienne est exercée pour s'assurer du bon état général des animaux. Des manipulations (simulations de la contention) et des préhensions sont réalisées par les zootechniciens pendant les 5 jours précédant le début des TP afin de réduire le niveau d'anxiété de l'animal.

Il y aura 1 session de formation par an. Chaque session de formation impliquera l'utilisation de 16 souris et 16 rats maximum. Lors de chaque session 2 animaux, un rat et une souris, seront mis à mort afin de montrer 2 procédures réglementaires d'euthanasie (surdose d'anesthésique et rupture

cervicale) et différents organes seront prélevés afin d'apporter des compléments d'anatomie et de physiologie aux cours magistraux. A l'issue de la formation, les animaux non euthanasiés (15 rats et 15 souris par session) pourront être réutilisés, après avis du vétérinaire référent, dans d'autres projets autorisés dans l'établissement. Le projet utilisera un maximum de 80 souris et 80 rats sur 5 ans. Aucun dommage particulier n'est attendu au cours de ces formations, les procédures étant classées légères. De plus, les animaux seront observés quotidiennement afin de s'assurer de leur bon état général.

15862 La dépendance aux opiacés est un problème majeur de santé publique. Des recherches sont entreprises pour identifier des traitements capables d'aider à l'arrêt durable de la consommation, notamment en réduisant les effets du sevrage et les risques de rechute. L'objectif de ce projet est d'évaluer des composés de l'industrie pharmaceutique pour leurs capacités thérapeutiques dans ces deux domaines. L'étude se fait au moyen de modèles validés chez le rat.

L'avantage en est le contrôle strict de la consommation, ou exposition, préalable de drogue et des conditions d'application du composé.

Dans ce projet nous prévoyons d'utiliser un nombre total de 420 rats non-consanguins, sur une période de 5 ans. Cela correspond à une estimation de 5 expériences sur le risque de rechute (36 rats par expérience) et 5 expériences sur les effets du sevrage (48 rats par expérience).

Nous minimisons les contraintes liées à ce type d'études (chirurgies vasculaires, hébergement individuel) en portant une attention particulière à la mise en pratique des principes éthiques fondamentaux (principe des 3R

Remplacement, Réduction, Raffinement).

Remplacement : Seul le modèle animal permet d'interroger les mécanismes neurobiologiques difficilement accessibles chez l'homme.

De plus, l'étude du comportement addictif ne peut se réduire à la simple étude de l'effet de la drogue. Ce comportement met en jeu des mécanismes psychopharmacologiques complexes (conditionnement, perte de contrôle, impulsivité, compulsivité) qui ne peuvent pas être appréhendés par des modèles ex vivo.

Le rongeur est en effet utilisé depuis 1960 pour modéliser la prise de drogue et la rechute du comportement au travers de la procédure d'autoadministration intraveineuse, ainsi que pour modéliser les effets physiques et psychologiques du sevrage aux opiacés après expositions chroniques à la drogue.

Réduction : L'utilisation d'un trop grand nombre d'animaux est contraire à l'éthique, mais si trop peu d'animaux sont utilisés, l'expérience peut manquer de puissance statistique. Nous utilisons donc une méthode reconnue pour estimer le nombre minimum d'animaux nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement exploitables dans les études comportementales.

Raffinement : Pour définir les dommages et contraintes subis par l'animal, nous avons établi une grille d'évaluation clinique et de surveillance. Pour réduire au maximum les conséquences de ces dommages, nous mettons en oeuvre les moyens suivants enrichissement de l'environnement, soins pré-, per- et post-opératoires, manipulation quotidienne après l'intervention chirurgicale, phases d'habituation aux tests comportementaux et aux procédures d'administration des composés, manipulation et examen quotidiens ou bi-quotidiens, définition de points limites suffisamment précoces et mise en place de critères d'arrêt. L'état de santé et l'attitude générale des animaux seront donc évalués individuellement une ou deux fois par jour. L'animal sera pesé au minima une fois par semaine.

15863 Le tractus digestif des animaux héberge une communauté microbienne extrêmement diversifiée qui interagit en permanence avec l'hôte. En effet, la flore intestinale (microbiote) influence considérablement la physiologie de l'hôte, notamment à travers les fonctions digestives et métaboliques mais on s'aperçoit également que cette communauté d'organismes est associée à des nombreuses pathologies et pourrait aussi expliquer la sensibilité ou au contraire la résistance des hôtes à certains parasites. Le lien entre microbiote et pathologies ou microbiote et parasites ne

s'explique pas seulement par l'effet barrière que constitue la flore intestinale à l'égard d'agents infectieux, mais aussi par ses interactions très étroites avec le système immunitaire de l'hôte. Parmi les effets du microbiote sur l'immunité de l'hôte une attention croissante est portée aux conséquences anti-inflammatoires. En effet, certains micro-organismes de la flore bactérienne sont capables de réguler la réponse inflammatoire de l'hôte.

Nous visons à explorer comment l'environnement que représente l'hôte peut conditionner l'évolution du potentiel anti-inflammatoire d'un probiotique, et à identifier si la sensibilité de différentes lignées de souris au parasite intestinal *Heligmosomoides polygyrus* s'explique par des différences de microbiote entre lignées.

Les expériences porteront sur des souris femelles des lignées suivantes SwissRjOrl, B6CBAF1/JRj, BALB/cJRj et SJL/JRj pour un effectif total de 275 individus.

Le nombre d'individus est restreint au maximum préservant des possibilités statistiques. Dans la mesure où nous nous intéressons à des configurations d'interactions complexes hôtes-microbiote ou hôtes-microbiote-parasite intestinal impliquant les réactions de l'organisme dans son ensemble, des expériences de substitution *in vitro* ne sont pas envisageables. Les animaux seront suivis quotidiennement et, le cas échéant, les individus présentant une dégradation de leur état général seront immédiatement retirés de l'expérience. Les animaux seront maintenus par groupes de 5 par cage afin d'assurer un contexte social et leur milieu de vie sera enrichi.

15864 Les effets des perturbateurs endocriniens sont observés depuis des décennies. Les perturbateurs endocriniens sont définis par l'OMS comme des substances ou des mélanges exogènes possédant des propriétés dont l'on peut attendre qu'elles conduisent à une perturbation endocrinienne sur un organisme intact ou sa descendance. L'agence européenne des produits chimiques (ECHA) et l'Autorité européenne pour la sécurité des aliments (EFSA) ont publié un guide définissant les moyens d'évaluer le caractère perturbateurs endocrinien des substance ou mélanges « Guidance for the identification of endocrine disruptors in the context of Regulations (EU) No 528/2012 and (EC) No 1107/2009 » Dans ce contexte l'essai de croissance et de développement de larves d'amphibiens (LAGDA) suivant la ligne directrice OCDE 241 ou une méthode équivalente peut être utilisé. L'essai de croissance et de développement de larves d'amphibiens (LAGDA) décrit un essai de toxicité mené sur une espèce d'amphibiens. Cet essai (d'une durée de 16 semaines, en général) consiste à étudier la croissance et le développement des amphibiens depuis la fécondation jusqu'à la période juvénile précoce. Il permet d'évaluer le développement initial, la métamorphose, la survie, la croissance et la maturation partielle du système reproducteur. Il permet également de mesurer une série d'autres effets observés en vue d'une évaluation diagnostique des produits chimiques suspectés d'être des perturbateurs endocriniens, ou d'autres types de substances ayant des effets toxiques sur le développement et la reproduction. Le LAGDA est utilisé comme essai de niveau supérieur sur amphibien pour recueillir des informations plus complètes sur les relations concentration-réponse induisant des effets néfastes, informations qui servent ensuite pour l'identification et la caractérisation des dangers ainsi que pour l'évaluation du risque écologique. Dans le cadre de cet essai, un test complet nécessite au maximum 640 embryons. Le nombre maximum de xénopes sur 5 ans sera de 6400 amphibiens. Le guide définit une approche par niveau des tests à réaliser. Ainsi, dans un premier temps, la substance ou le mélange est évalué(e) à l'aide de méthode *in vitro*. L'essai OCDE 241 est réalisé dans le cadre de demande des autorités pour la confirmation ou non du caractère perturbateur endocrinien. Dans un but de réduction du nombre d'animaux utilisés, la ligne directrice préconise l'utilisation au minimum de 4 concentrations de la substance d'essai. Dans un contexte de raffinement, les amphibiens seront maintenus dans un environnement permettant une croissance optimale en termes de qualité d'eau et d'alimentation.

15865 La tularémie est une maladie zoonotique présente chez plus de 250 espèces animales, comme les lapins, les lièvres et les petits rongeurs. La bactérie responsable, *Francisella tularensis*, peut être aussi véhiculée par les tiques et les moustiques. Plusieurs sous-espèces (ssp) de *F. tularensis* existent. Les ssp *tularensis* et les ssp *holarctica* sont hautement pathogènes pour l'Homme. Du fait de sa possible transmission par aérosol, cette bactérie peut être utilisée comme agent de bio-

terrorisme mais il n'y a pas de contagion Homme à Homme. Jusqu'à aujourd'hui, la seule souche qui peut être utilisée comme prototype vaccinal et uniquement pour le personnel de laboratoire, est dérivée de la ssp *holarctica* et désignée LVS (pour Live Vaccine Strain). Pour diminuer les risques encourus par les manipulateurs, on utilise la ssp *novicida*, car elle n'est pas pathogène pour l'Homme.

Néanmoins, elle est toujours hautement virulente pour la souris et peut donc servir de modèle de pathogénicité car il y a plus de 90% d'homologie entre les génomes des différentes ssp.

Pour mieux comprendre les différentes étapes moléculaires nécessaires à la pathogénicité de cette bactérie, nous nous intéressons à l'interaction de la bactérie avec sa cellule-hôte et à son effet sur le métabolisme cellulaire et bactérien. Nous nous intéressons plus particulièrement aux gènes codant pour les protéines de la voie des pentosephosphate, voie parallèle à la glycolyse. Une définition plus précise des gènes impliqués dans la virulence devrait nous permettre de développer de nouveaux agents vaccinaux pré- ou post-infection.

Le modèle humain ne pouvant servir que « *in vitro* », en utilisant des cellules en lignée permanente, le modèle murin, lui, nous permet l'étude « *in vivo* » de l'efficacité de la délétion des gènes pouvant être impliqués dans la virulence de la bactérie. La souris est un excellent modèle animal car elle fait partie des espèces infectées dans la nature. Les souris Balb/C femelles sont choisies de 6-8 semaines pour leur poids, leur taille et leur niveau de réponse immunitaire.

L'expérience prévue consistera à injecter par voie intra-péritonéale un inoculât d'une suspension bactérienne d'un mutant obtenu par délétion d'un gène susceptible d'intervenir dans la virulence. Un nombre maximum de 350 souris devrait permettre l'étude de 5 gènes, pendant 5 ans. Après infestation, les souris seront observées pendant 48 h au maximum, puis mises à mort.

Nous avons choisi une dose d'infection, une durée d'observation, et un modèle d'infection expérimentale raffinés pour permettre le développement bactérien *in vivo* tout en limitant ses conséquences sur le bien-être animal. La mise en place de points limites opérationnels et précoces protégera l'animal de conséquences cliniques inattendues, respectant ainsi le principe des 3R.

Après euthanasie des souris, on vérifiera l'atténuation de la virulence en prélevant leurs organes, comme la rate et le foie et en y comptabilisant les CFU (Colony Forming Unit) observées sur boîte chocolat. Les résultats obtenus seront analysés statistiquement, grâce au nombre minimum mais suffisant de souris observées par lot et par groupe et par la répétition de l'expérience au moins une fois. Les résultats obtenus devraient nous permettre d'envisager de nouvelles stratégies de prévention de la tularémie et le développement de nouveaux agents vaccinaux pré- ou post-infection.

15866 La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est la maladie neurodégénérative la plus fréquente du système moteur adulte. A ce jour, elle reste une pathologie incurable et toujours fatale, 2 à 5 ans après l'apparition des premiers symptômes, généralement pour cause d'insuffisance respiratoire. La SLA présente des formes sporadiques et familiales parmi ces dernières 5 à 20% des cas découlent de mutations du gène de la superoxyde dismutase à cuivre et zinc 1 (SOD1), et 5% de mutations du gène Fused in sarcoma (FUS). Sur cette base génétique, diverses lignées de souris transgéniques ont été mises au point et reproduisent les principales caractéristiques et les symptômes de la maladie. Ces lignées transgéniques sont à la base des recherches expérimentales menées à l'heure actuelle dans le domaine de la SLA. L'un des symptômes principaux de la SLA est la perte de poids, et l'importance de cette perte de poids est un marqueur pronostique de la survie des patients. Les mécanismes qui provoquent cette perte de poids ne sont pas connus. Des études récentes ont suggéré que les centres de contrôle de la prise alimentaire, situés dans le cerveau dans une région appelée hypothalamus, sont affectés par la maladie.

L'objectif de ce projet de recherche est de déterminer si les modèles animaux de SLA répondent de façon adéquate à des stimuli hormonaux affectant la prise alimentaire. Ces expériences permettront de mieux définir les atteintes hypothalamiques dans la maladie et définiront de nouvelles stratégies pour contrecarrer la perte de poids.

Cette étude concerne un total de 1876 souris (génétiquement modifiées ou pas) au maximum sur une durée de 5 ans.

Conformément à la règle des 3R, une attention particulière a été portée afin d'optimiser au mieux les protocoles, de réduire le nombre d'animaux utilisés et d'améliorer et raffiner leurs conditions de vie.

Remplacement La complexité du signal de la perte de poids nous oblige à travailler chez le mammifère et dans l'animal entier. En effet, les variations du poids corporel ne peuvent être étudiées que dans un organisme entier. De plus, les réseaux neuraux qui contrôlent centralement ces mécanismes ne peuvent pas être encore modélisés ou reproduits *in vitro*. Il n'est donc pas possible de remplacer le modèle murin par un modèle cellulaire ou informatique.

Réduction Le nombre d'animaux utilisés est strictement calculé pour utiliser le nombre d'animaux suffisant et nécessaire à la réalisation du projet.

Raffinement Les animaux auront accès ad libitum à l'eau et à la nourriture, bénéficieront de conditions de température et d'hygrométrie régulées et conformes aux règles en vigueur. L'enrichissement de l'environnement des animaux (bâtonnets à ronger, coton compressé pour faire des nids, maisons en plastique rouge), le maintien des interactions sociales et la surveillance quotidienne des animaux permettront de s'assurer de leur bien-être et de détecter rapidement tout changement de comportement associé ou non aux pathologies étudiées afin qu'il puisse être pris en charge. De plus, nous appliquerons également le principe de raffinement au niveau des méthodes de pré-anesthésie, d'anesthésie et de prise en charge analgésique.

En effet, durant toute la durée de l'intervention chirurgicale la température corporelle sera maintenue constante via un tapis chauffant.

Ce projet a été pensé pour favoriser le bien-être animal et pour limiter le maximum l'inconfort et la douleur éventuelle des animaux. C'est pour cela que des points limites précis seront établis (perte de poids, difficultés métaboliques, etc.). De plus, l'étude a été pensée pour intervenir avant toute apparition des symptômes de la maladie, et devrait les retarder. Toute apparition des symptômes précoce induirait un arrêt de la procédure.

Au-delà de la SLA, ce projet est destiné à contribuer à l'effort commun de recherche sur l'étiologie des maladies neurodégénératives du système moteur.

15867 Les cellules immunitaires, en particulier les lymphocytes cytotoxiques (L-cyt) participent à lutter contre les cellules cancéreuses qui persistent de manière invisible dans la maladie résiduelle. Ces cellules sont stimulées par l'exposition aux antigènes tumoraux. Cependant, quand la stimulation persiste trop longtemps, les L-cyt s'épuisent et se mettent au repos. Les inhibiteurs des « check-points », appartenant à une nouvelle classe de traitements anticancéreux appelée immunothérapie, permettent de lever les freins qui bloquent ces L-cyt et ainsi de les réactiver. Dans le mélanome, environ 30 % de réponses partielles ou complètes sont observées sous ces traitements. Le problème est que ces traitements sont peu favorables à la transformation de L-cyt en une forme particulière de lymphocytes mémoires (L-mem) qui survivent en l'absence de stimulation et peuvent se réactiver d'eux-mêmes en cas de réapparition des antigènes tumoraux. Ainsi, quand le patient est au stade de maladie résiduelle, les L-cyt vont mourir ce qui peut conduire à la rechute du cancer. L'interleukine 2 (IL-2) est une cytokine (hormone produite par les cellules immunitaires) particulièrement étudiée dans le cancer. Le traitement par IL-2 a été la première immunothérapie approuvée dans le cancer. Cependant, seul un faible pourcentage de patients répond (6% dans le mélanome). L'IL-2 agit sur de nombreux types cellulaires différents et l'on ne sait à quel degré elle agit sur les différentes cellules présentes dans la tumeur. A faible dose, l'IL-2 permet de transformer des L-cyt en L-mem mais elle active aussi les lymphocytes régulateurs qui vont supprimer l'activité des L-cyt.

La combinaison d'une immunothérapie par inhibiteur des « check-points » avec l'IL-2 apparaît ainsi séduisante. Un des objectifs est de comprendre comment ces molécules peuvent agir de manière synergique sur les caractéristiques des L-cyt. Un autre objectif est de réaliser une cartographie de l'action de l'IL-2 dans la tumeur pour mieux comprendre son fonctionnement. Mon troisième objectif

est de créer une nouvelle forme d'IL-2 qui permettrait d'agir spécifiquement sur L-cyt pour les rendre mémoire. Pour réaliser mon projet, je vais utiliser le mélanome comme modèle. Ce programme de recherche, qui pourra s'appliquer à d'autres cytokines, permettra de mieux comprendre leur rôle et le sort des lymphocytes dans l'immunité anti-tumorale. Il offre enfin de nouvelles perspectives thérapeutiques pour les patients.

La recherche dépend de manière critique de l'utilisation de modèles animaux, car les interactions complexes qui se produisent au sein du système immunitaire et les cellules cancéreuses *in vivo* ne peuvent pas totalement être reproduites *in vitro*. Les souris sont des organismes modèles de choix car leur système immunitaire est très similaire à celui de l'homme. Pour les modèles tumoraux et le suivi des réponses des cellules T spécifiques à la tumeur, 750 souris devraient être utilisées au cours de cette étude.

Afin de respecter le principe de réduction, les expériences ont été conçues afin de coordonner plusieurs paramètres d'analyse à partir d'expériences individuelles et permettent une analyse longitudinale. Cela a réduit le nombre total d'animaux requis. De plus, si les premiers résultats obtenus sont statistiquement significatifs et suffisamment homogènes, le nombre d'animaux et de répétitions d'expérimentations sera diminué.

Quand cela est possible, des expériences *in vitro* seront réalisées afin de reproduire les données pertinentes du phénomène *in vivo* afin de réduire l'utilisation des animaux. Par exemple, nous n'utiliserons que quelques animaux afin de générer un grand nombre de cellules T par culture *in vitro*. De cette manière, l'expansion de cellules permet de disposer de suffisamment de matériel pour une analyse génomique biochimique et fonctionnelle en aval, sans avoir à utiliser un grand nombre de souris.

Les conditions d'hébergement ainsi que les méthodes utilisées seront les plus appropriées pour réduire au maximum toute forme de souffrance physique et morale que pourraient ressentir les animaux. Les indicateurs de souffrance tels que le poil hérissé, l'absence de mouvement, la taille de la tumeur excédant 10% du poids de l'animal et/ou des ulcérations de la tumeur seront observés quotidiennement.

15868 Les maladies infectieuses sont responsables de plus de 17 millions de décès par an dans le monde. Elles représentent la troisième cause de mortalité en France avec un impact sanitaire et économique majeur. Les bactéries dites « pathogènes » sont majoritairement responsables de ces maladies, soit par leur simple présence dans les tissus infectés et de la réponse de l'organisme induite par cette infection, soit par la production par ces microorganismes de molécules et/ou de toxines, aussi appelées « facteurs de virulence ».

L'inflammation est un mécanisme qui permet à l'organisme de se défendre contre les infections microbiennes, mais qui dans certains cas peut entraîner des déficits immunitaires et des cancers. Une bonne connaissance des phénomènes de contrôle de cette inflammation est donc indispensable pour la protection de l'hôte contre les microbes.

Chez certaines bactéries pathogènes, des facteurs de virulence ont été mis en évidence qui permettent à la bactérie d'infecter l'hôte. C'est le cas de certaines souches d'*Escherichia coli*, responsables d'infections urinaires, qui sont capables de produire les toxines Cnf1 et HlyA, qui vont jouer des rôles opposés HlyA permet au microbe d'infecter l'hôte et Cnf1 permet à l'hôte de se défendre contre ce microbe. L'hôte met ainsi en place une réponse immunitaire antimicrobienne. Cette réponse antimicrobienne dépend de la reconnaissance des toxines bactériennes par des récepteurs situés à la surface des cellules immunitaires. Cette reconnaissance entraîne la formation d'un complexe multi moléculaire, appelé « inflammasome » pour aboutir à l'élimination du pathogène. Dans le cas d'*Escherichia coli*, ce complexe a été identifié comme étant l'inflammasome Nlrp3. Des études *in vitro*, dans des cellules de souris et humaines, et *in vivo*, chez la souris, ont mis en évidence le rôle de Nlrp3 dans l'infection microbienne.

Le but de ce projet est d'identifier les systèmes de régulation de Nlrp3 dans la reconnaissance de la bactérie par l'hôte qu'elle infecte. Une étude de la littérature, et des résultats préliminaires obtenus *in vitro* sur cellules ont mis en évidence le rôle de deux autres protéines Pak1 et la Gasdermine D

(GsdmD) dans la réponse immunitaire anti-bactérienne. Nous souhaitons donc confirmer le niveau d'implication de ces protéines dans la bactériémie (présence de bactéries dans le sang) induite par *Escherichia coli* chez la souris.

De par l'étendue actuelle et à venir de la résistance aux antibiotiques, le développement de nouveaux médicaments dans le traitement des infections est crucial. Une meilleure compréhension des mécanismes mis en jeu dans ces échanges entre l'hôte et le pathogène devrait permettre d'identifier de nouvelles cibles pour de nouvelles applications thérapeutiques dans la prise en charge des patients atteints d'infections bactériennes.

Pour ce projet, nous utiliserons au maximum 1800 souris dans 3 procédures. La première procédure prévoit l'infection de souris sauvages, ou de souris génétiquement modifiées pour étudier l'impact des gènes étudiés, ces modifications n'entraînant aucune pathologie chez ces souris. La deuxième procédure prévoit une greffe de moelle osseuse, procédure semblable à ce qui est fait chez l'homme les souris receveuses sont irradiées et greffées avec de la moelle osseuse de souris donneuse. La greffe de moelle osseuse nous permettra d'étudier le rôle des cellules immunitaires myéloïdes (issues de la moelle osseuse). La troisième procédure nous permettra de visualiser la formation du complexe multi moléculaire induit par l'infection.

Afin de mener notre étude dans le respect du bien-être animal nous respecterons la règle des 3R remplacement, raffinement et réduction. Dans un souci de remplacement, l'ensemble de ces expériences ont été réalisées *in vitro* sur des cultures de cellules de souris et humaines, et il est maintenant nécessaire d'étudier ce phénomène complexe dans un organisme complet. Dans un souci de réduction, afin d'obtenir des résultats significatifs, nous utiliserons des groupes de 10 souris, mâles et femelles, et chaque expérience sera réalisée trois fois. Cependant, et toujours dans un souci de réduction, si après deux expériences les résultats obtenus sont statistiquement significatifs, la troisième expérience ne sera pas réalisée. Dans un souci de raffinement, les souris seront manipulées avec douceur par du personnel expérimenté, afin de ne pas induire de stress inutile. Les souris vivant en groupe, elles seront hébergées (5 souris par cage) dans un environnement enrichi (igloo et nest) leur permettant de faire un nid. Enfin, dans un souci à la fois de réduction et de raffinement, dans la procédure 3 nous utiliserons une technique d'imagerie intra vitale sur des animaux préalablement anesthésiés permettant plusieurs observations des mêmes animaux au cours du temps.

Notre expérience d'infection sur le modèle utilisé nous a permis de constater qu'il n'y avait pas de souffrance apparente chez les animaux ni lors de l'injection des bactéries par voie intraveineuse ni suite à l'infection et durant les 72h maximum que dure l'expérience. Nous considérerons cependant les critères d'appréciation de la douleur selon une grille de score. En cas d'apparition de ces signes de souffrance, l'animal sera tout particulièrement surveillé. Si ceux-ci persistent plus de 24h, les animaux concernés seront euthanasiés.

15869 La daurade royale (*Sparus aurata*) et le loup (*Dicentrarchus labrax*) sont des espèces côtières de premier plan en Méditerranée française, tant pour l'importance de leur exploitation, leur valeur commerciale et leur aquaculture, que pour leurs aspects emblématiques dans la région. Aujourd'hui concernées par les plans de gestion des petits métiers en Méditerranée, de nombreux aspects de leurs cycles de vie restent pourtant inconnus, limitant la capacité des scientifiques à fournir un appui aux gestionnaires. Les lagunes méditerranéennes sont particulièrement importantes comme zones de nourricerie estivales pour ces espèces migratrices, mais leur dynamique spatiale en relation avec les caractéristiques des habitats lagunaires reste inconnu. En particulier, il est maintenant essentiel de comprendre comment l'utilisation des habitats lagunaires sera affectée par les changements climatiques, en particulier une augmentation graduelle de la température et un accroissement d'évènements dystrophiques estivaux ('malaïgues'), qui impliquent des extrêmes de température et des épisodes d'hypoxie.

Ce projet vise à comprendre la capacité des daurades et loups sauvages à tolérer des changements de la température et des épisodes d'hypoxie, et comment cette tolérance influence leur performance et leur survie. Des individus de chaque espèce seront instrumentés sous anesthésie avec des capteurs électroniques qui enregistrent leur fréquence cardiaque et leur accélération. Les poissons

seront ensuite exposés, en groupe dans leur bassin ou individuellement dans des chambres métaboliques, aux conditions suivantes

1- Augmentation progressive de température. La température sera augmentée en paliers de 1°C par heure, selon la procédure de la 'critical thermal methodology'.

2- Diminution progressive de température. Même procédure que pour l'augmentation de température mais avec réduction en paliers de 1°C par heure.

3- Hypoxie progressive. L'hypoxie sera créée en étapes progressifs en gazant l'eau avec l'azote comprimé.

L'impact des conditions environnementales sur la performance individuelle sera dérivé des données de fréquence cardiaque qui seront mises en relation avec des données de taux métabolique dans les chambres métaboliques. Les données d'accélération sont un indicateur de niveau d'activité individuel. Les données obtenues permettront d'identifier des seuils de tolérance à la température et à l'hypoxie qui engendrent des réponses comportementales telles que le changement du comportement de nage, ou des réponses d'évitement. A des niveaux extrêmes, ils permettent de mettre en évidence des menaces à la survie telles que des arythmies cardiaques.

Les protocoles suivent la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner)

Remplacer il est impossible de remplacer les daurades et les loups sauvages par des autres modèles, l'intérêt du projet étant justement de regarder l'impact sur ces espèces.

Réduire Une étude préliminaire sera menée sur des individus issus d'aquaculture (n = 12 par espèce, acclimatés à 21°C) pour perfectionner les procédures d'exposition et pour mieux comprendre les réponses des animaux libres de leurs mouvements. Le nombre d'individus sauvages testés sera n = 18 de chaque espèce, qui permettra de révéler les réponses espèce-spécifique à la température et à l'hypoxie, et les seuils de tolérance.

Raffiner Tout a été mis en place dans le cadre des procédures pour limiter la souffrance et le stress des animaux pendant les mesures. Le capteur sera placé dans la cavité péritonéale sous anesthésie, en proximité du cœur afin de capter les signaux bioélectriques (électrocardiogramme) qui permettent de calculer la fréquence cardiaque. Le placement des capteurs dans la cavité péritonéale sera sous anesthésie et suivi par un minimum de 48h de récupération dans un bassin interne isolé des perturbations humaines, avec une alimentation journalière « ad-libitum ». La procédure de la 'critical thermal methodology' et d'exposition à l'hypoxie progressive sont des techniques largement maîtrisées et utilisées par l'ensemble de la communauté scientifique, ainsi que par notre équipe. Pendant les procédures en bassin, les poissons seront filmés pour enregistrer le comportement des animaux. Au moment où un poisson montre des signes de stress comportemental (réponses de fuite, léthargie, perte d'équilibre), il sera enlevé rapidement et placé dans un deuxième bassin rempli d'eau aérée et à température d'acclimatation, à l'abri de toute nuisance visuelle et sonore. Les mesures en chambre métabolique sont aussi largement maîtrisées et utilisées par notre équipe, au moment où un poisson montre des signes de stress comportemental, l'eau dans la chambre sera rapidement remplacée par de l'eau bien aérée à 21°C. Les poissons auront un minimum de 24h de récupération entre chaque procédure.

15870 L'hypertension artérielle (HTA) est la première pathologie chronique en France. Elle représente un coût de 2,6 milliards d'euros, derrière le cancer et devant le diabète. Elle touche plus particulièrement 25% des plus de 35 ans. Dans le monde, 26.4% de la population en souffre soit 972 millions de personnes, dont 333 millions dans les pays développés et 639 millions dans les pays en voie de développement. Selon l'organisation mondiale de la santé, elle serait à l'origine de la mort de 9 millions de personnes par an. On estime aussi qu'en 2025 dû au vieillissement de la population mondiale, le nombre de patients hypertendus devrait monter jusqu'à 60 %, soit 1,56 milliard de personnes. Ces chiffres permettent de bien comprendre l'enjeu de santé publique que représente cette pathologie.

Liée à une pression anormalement élevée du sang dans les vaisseaux sanguins, l'HTA est aussi l'une des principales causes de risques cardiovasculaires, d'accidents vasculaires cérébraux (AVC) ou de troubles respiratoires avec des cas d'hypertension pulmonaire. L'HTA peut aussi entraîner à

terme des complications graves au niveau de certains organes cibles comme les reins via une insuffisance rénale chronique dont la sévérité varie selon les patients. Des mesures diététiques, des modifications du mode de vie associées ou non à des traitements médicamenteux aident à normaliser l'hypertension. Cependant, il faut noter qu'en raison de l'absence de symptômes révélateurs, l'HTA est souvent diagnostiquée tardivement. De plus, les patients dépistés ne prennent pas toujours de traitements et environ 30% de ceux traités ne retrouvent pas une pression artérielle normalisée. Pour remédier à ce problème sanitaire majeur, il est donc urgent de rechercher de nouvelles cibles thérapeutiques non seulement capables de guérir l'HTA mais aussi de soigner les dégâts secondaires qu'elle peut entraîner sur l'organisme.

A l'heure actuelle, l'hypertension peut être étudiée sur des modèles de cultures cellulaires. Ces modèles cellulaires ne rendent toutefois pas compte des échanges et interactions mis en jeu entre les différents types cellulaires et les différents organes d'un organisme entier lors de la mise en place l'HTA. Les résultats obtenus avec ses expériences *in vitro* nécessitent donc une validation dans des modèles physiologiques capables de rendre compte de leurs effets sur les divers tissus de l'organisme affectés secondairement par l'HTA. Plusieurs modèles de rongeurs ont alors été développés comme les lignées de rats MWF, MWF-6-SHR, MWF-8-SHR, SHR, WKY-BP1, SHR-SP, BMPR2. Ces modèles présentent tous un phénotype hypertensif plus ou moins modéré associé ou non à une ou plusieurs comorbidités comme des atteintes rénales reliées ou non à une protéinurie, des atteintes cérébrales ou des atteintes respiratoires. Ils apparaissent ainsi comme des modèles complémentaires les uns des autres, reflétant la fluctuation et la variabilité des symptômes retrouvés chez les patients souffrant d'HTA. Ils sont donc nécessaires à une étude minutieuse de l'HTA. La plupart des approches thérapeutiques disponibles actuellement en clinique ont d'ailleurs été développées à l'aide de ces différents modèles.

L'objectif du présent projet est de maintenir en élevage des rats de ces différentes lignées et de produire des lots expérimentaux. Les animaux générés dans ce projet seront destinés à l'étude de traitements contre l'hypertension et de ses comorbidités. Afin de satisfaire au raffinement, l'hébergement des animaux sera réalisé dans des locaux appropriés, avec un enrichissement systématique des cages (bâtons de bois à ronger et matériel de nidification) et un personnel habilité qui réalisera les différentes procédures en respectant les règles d'éthiques, le bien-être animal et le principe des 3R. Nos surveillances quotidiennes nous permettront d'identifier d'éventuels rats en souffrance et de prendre les mesures nécessaires (surveillance accrue, mise à mort dans les cas les plus graves). Pour pouvoir constituer les lots requis pour ces études, nous estimons qu'est nécessaire sur 5 années de recherche un total de 40 700 animaux, soit

- 6 300 MWF
- 6 300 MWF-6-SHR
- 6 300 MWF-8-SHR
- 6 300 SHR
- 2 300 SHR-SP
- 2 300 WKY-BP1
- 10 900 BMPR2.

15871 Les gliomes (ou tumeurs gliales) correspondent à un type particulier de tumeurs cérébrales dont le grade de malignité est extrêmement variable d'un patient à l'autre. Les plus sévères d'entre eux (c'est-à-dire de grade IV ou glioblastomes) sont caractérisés par un pronostic vital très sombre du fait de leur résistance aux thérapies conventionnelles (chirurgie suivie d'une radio-chimiothérapie) et par conséquent de la rechute systématique de la maladie. Le développement de nouveaux principes actifs est donc un défi permanent.

Le projet consiste à évaluer les effets anti-tumoraux de différentes approches thérapeutiques (chimiothérapie délivrée par voie systémique ou locale associée ou non à une radiothérapie) dans des modèles orthotopiques (c'est-à-dire à leur emplacement anatomique habituel) de tumeurs gliales induites chez les rongeurs par implantation intracrânienne de cellules de gliome. En cas

d'approche thérapeutique locale, l'administration intracérébrale (voie intra-tumorale) pourra nécessiter la mise en place d'une canule à demeure cette canule pouvant servir à la fois pour l'inoculation des cellules tumorales et pour l'administration des substances à l'essai.

Un suivi longitudinal et non-invasif de la croissance tumorale pourra être réalisé par l'utilisation des techniques d'imagerie optique comme la bioluminescence et la fluorescence *in vivo*, ou de l'imagerie par résonance magnétique (IRM).

La durée totale de suivi dépend de la cinétique de croissance tumorale *in vivo* des cellules implantées ainsi que de l'apparition des signes cliniques associés à la tumeur (de quelques semaines à plusieurs mois – 6-9 mois – selon le type et l'origine des cellules tumorales implantées). En fin d'expérience, le cerveau des animaux contenant la tumeur pourra être prélevé pour analyses. D'autres prélèvements de tissus ou de sang pourront être effectués en phase terminale.

Au cours de chaque étude de ce projet, différents groupes d'animaux seront constitués (en général 4 groupes avec 10 animaux par groupe). Pour ce projet d'une durée de 5 ans, il est prévu un nombre maximum de 1200 souris (4 groupes de 10 souris par étude x 6 études par an x 5 ans) et 400 rats (4 groupes de 10 rats par étude x 2 études par an x 5 ans).

Remplacement dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez le rongeur (souris ou rat) car il n'existe pas de méthode alternative (*in vitro* ou *in silico*) permettant de se substituer complètement aux essais *in vivo* pour évaluer les effets d'une nouvelle approche thérapeutique sur les gliomes. Avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité ou de la toxicité d'un candidat médicament. À ce jour, les rongeurs (souris ou rat) sont les espèces les plus adaptées à ce type de modèle d'étude.

Réduction Un nombre minimal et homogène d'animaux par étude est utilisé afin d'exploiter de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et afin d'avoir un nombre d'animaux suffisant pour réaliser une analyse statistique.

Raffinement dans ce projet, le raffinement est effectué par

- la mise au point de procédures rigoureuses
- la formation du personnel
- un suivi quotidien de l'état de santé des animaux
- le recours à des procédures peu invasives et peu douloureuses lors du suivi tumoral par imagerie
- la recherche des points limite
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire
- l'utilisation de techniques d'analyses et de dosage adaptées nécessitant le moins de volume sanguin possible lors des prélèvements.

15872 Ce projet aborde les mécanismes physiopathologiques de la progression de la maladie rénale chronique (MRC) liée à l'acidose. La MRC est caractérisée par la perte progressive de la fonction rénale liée au développement d'une inflammation puis d'une fibrose qui détruit le tissu tubulo-interstitiel de façon irréversible. La diminution de la fonction rénale est responsable de l'accumulation d'acide dans le tissu rénal qui à terme aboutit à une acidose métabolique, une complication inéluctable de la MRC. Plusieurs études cliniques ont mis en évidence une association entre l'acidose métabolique et la progression de la MRC. Et inversement, des essais cliniques récents démontrent que la supplémentation orale en alcalins qui corrige l'acidose chez les patients insuffisants rénaux ralentit la progression de la MRC. Par ailleurs, l'acidose métabolique semble aussi entraîner des anomalies du métabolisme du glucose, ce qui pourrait expliquer l'insulinorésistance qui est communément associée à la MRC.

Les mécanismes physiopathologiques responsables des effets délétères de l'acidose dans la progression de la MRC restent inconnus. Les voies de signalisation activées lors de cette réponse adaptative pourraient entraîner la survenue d'un infiltrat inflammatoire qui favoriserait le développement de la fibrose au cours de la maladie rénale.

Nous proposons de tester l'hypothèse selon laquelle les voies de signalisation mise en jeu lors de la réponse adaptative rénale à une charge acide aient un rôle dans l'infiltration inflammatoire du rein et le développement des troubles du métabolisme du glucose.

La maladie rénale chronique est une maladie complexe et seule l'expérimentation animale, mimant le plus fidèlement possible la maladie humaine, permettra d'étudier les mécanismes liés à l'acidose impliqués dans le développement de la fibrose rénale et l'installation de l'insulinorésistance.

Une acidose métabolique sera induite chez 2 lignées de souris sauvages de fonds génétiques différentes (129sv et C57Bl/6J) afin d'exclure les paramètres confondants liés à la souche. Les souris seront étudiées à différents temps sur une durée maximale de 6 mois.

Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum. Conformément à la réglementation 2013 concernant l'hébergement des animaux utilisés à des fins scientifiques, les souris sont logées, avant leur utilisation, dans des cages adaptées à l'intérieur des salles de stabulation de l'animalerie où l'ambiance est parfaitement contrôlée (hygrométrie, température, ventilation, bruit). De plus les cages sont équipées d'enrichissement pour limiter le stress. Avant les études, les souris sont hébergées en groupes sociaux afin de limiter l'isolement. De plus, afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, les procédures se dérouleront avec une surveillance journalière et des analgésiques sont prévus en cas de nécessité. Les prélèvements sanguins seront réalisés sous anesthésie générale pour éviter toute souffrance et les souris seront profondément anesthésiées avant l'euthanasie. Enfin, des points-limites ont été établis, entraînant le retrait ou la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire. Ce projet s'inscrit sur une durée de 5 ans. Le nombre de souris utilisées sera de 624 au total.

Ce projet nous permettra de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la progression de la maladie rénale chronique et le développement des troubles du métabolisme du glucose lié à l'acidose.

A terme, notre étude pourrait permettre le développement de nouveaux traitements ciblant les voies mises en cause, permettant le ralentissement de la progression de la maladie rénale chronique, repoussant ainsi la nécessité d'un traitement substitutif comme la dialyse ou la transplantation rénale.

15873 Tout au long de leur vie, nos cellules, incluant nos neurones, sont soumises à des stress cellulaires. Leur capacité à réagir à ce stress est déterminante pour leur survie. La protéine de réponse au stress TP53INP1 agit comme un double régulateur positif de la transcription, avec des effets anti-prolifératif et pro-apoptotique, et de l'autophagie (Saadi et al., 2015). Il a une fonction anti-oxydante majeure, en partie en contribuant à la mitophagie, un mécanisme important de contrôle qualité des mitochondries, qui élimine les mitochondries dysfonctionnelles productrices de ROS. Sa déficience a été liée au cancer et au syndrome métabolique par des mécanismes communs aux maladies neurodégénératives. En particulier, un lien a été établi entre déficience de TP53INP1 et syndrome métabolique au travers de mécanismes associant altération de la mitophagie, stress oxydatif et inflammation (Seillier et al., 2015). Ces travaux ont également montré que TP53INP1 interagit avec PINK1 et Parkine, deux protéines impliquées dans de multiples voies de réponse au stress, et dont les gènes sont impliqués dans des formes familiales de maladie de Parkinson (MP). Le rôle de TP53INP1 dans la réponse neuronale au stress a été étudié dans le contexte d'atteintes aiguës et lié à son rôle pro-apoptotique p53-dépendant. Son implication dans les maladies neurodégénératives reste largement inexplorée. TP53INP1 a récemment été identifié comme un gène de susceptibilité dans la maladie d'Alzheimer (MA) partagé avec le diabète de type 2 mais le mécanisme pathologique n'a pas encore été identifié. Or le diabète de type 2 a été associé à un risque accru de maladies neurodégénératives liées au vieillissement, dont la MA et la maladie de Parkinson (MP).

Dans ce projet, nous allons évaluer l'hypothèse d'un rôle de TP53INP1 dans le maintien de l'homéostasie neuronale, comme suggéré par son action dans la régulation positive de l'autophagie, en condition de stress chronique lié au vieillissement et aux maladies neurodégénératives, MA et

MP. L'étude sera focalisée sur les neurones dopaminergiques de la substantia nigra pars compacta (SNc) dont la neurodégénérescence massive et progressive caractérise la MP, et les neurones cholinergiques du télencéphale basal (notamment Noyau Basal de Meynert), dont la dégénérescence est associée à la MA. Le modèle de MP est obtenu par la surexpression d'Alpha-synucléine humaine à l'aide d'un vecteur viral (AAV) injecté dans la SNc par chirurgie stéréotaxique. Dans cet objectif, nous étudierons les conséquences de la délétion du gène codant cette protéine, en comparant des groupes de souris *Trp53inp1*^{-/-} et sauvages (WT) dans différents contextes expérimentaux par des approches comportementales, pour évaluer les déficits moteurs et cognitifs, et des expériences post-mortem par immunohistochimie quantitative, pour évaluer les pertes neuronales, et de RT-qPCR pour étudier les modifications moléculaires associées.

Ce projet respecte au plus près la règle des 3R. Le remplacement des expérimentations sur l'animal entier est difficile puisque nous étudions le cerveau dans son fonctionnement global et qu'aucun modèle de substitution *in vitro* n'est disponible à ce jour pour répondre aux questions posées. Par contre, si un effet neuroprotecteur de TP53INP1 était avéré au travers de ces études chez la souris, les mécanismes mis en jeu seront analysés au travers d'études sur des modèles cellulaires et chez la drosophile. La réduction est optimisée en couplant différentes approches, cellulaires et comportementales, sur les mêmes lots d'animaux, et le raffinement, en utilisant les meilleures conditions d'élevages et environnementales pour réduire le stress et l'inconfort (en groupe social avec enrichissement avec nids de coton, dômes, bâtonnets de bois en alternance) ainsi que l'éventuelle présence de souffrances lors de la procédure de chirurgie (suivi antalgique). Par notre expérience, nous n'avons que très rarement observé de complication lors du déroulement des expériences décrites. La mise à mort des animaux intervient donc à la toute fin des expériences par une anesthésie profonde avant le sacrifice. Tous les personnels du projet en charge des interventions réalisées sur les animaux sont qualifiés (changes, suivi et soins, chirurgies, manipulations).

Au total, un nombre de 310 souris sera utilisé dans ce projet qui vise à une meilleure compréhension de la pathophysiologie de certaines maladies neurodégénératives afin d'accroître nos connaissances sur leurs aspects fondamentaux, mais aussi de découvrir de nouvelles cibles ayant un potentiel thérapeutique.

15874 La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est la maladie neurodégénérative la plus fréquente après les maladies d'Alzheimer et de Parkinson. Elle est caractérisée par une mort sélective des motoneurons (cellules nerveuses qui contrôlent les muscles) accompagnée d'une atrophie musculaire, d'une paralysie progressive puis par le décès des patients, trois à cinq ans après le diagnostic de la pathologie. Depuis le début des années 2000, la SLA n'est plus considérée comme une maladie spécifique du motoneurone mais présente également une composante métabolique importante qui en fait d'elle une maladie systémique. Nous savons aujourd'hui que le métabolisme (utilisation du glucose (sucre) et des lipides (graisses) pour produire de l'énergie) joue un rôle important dans le développement et la progression de la pathologie. En effet, chez les malades atteints de SLA, le métabolisme est déjà altéré avant l'apparition des premiers symptômes moteurs. L'organisme utilise alors les lipides à la place du glucose tout en produisant moins d'énergie. A ce jour, en dehors de traitements symptomatiques peu efficaces, aucun traitement curatif n'est disponible. L'identification et la compréhension des mécanismes physiopathologiques de ce dysfonctionnement métabolique est un enjeu majeur pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques et la prise en charge optimale des patients.

Une enzyme clef du métabolisme (PDK4) est fortement augmentée chez les patients atteints de SLA ainsi que dans les animaux modèles de SLA et ceci avant même l'apparition des premiers symptômes moteurs des modèles animaux de SLA. Ce projet a pour objectif de vérifier si la diminution ou la suppression de l'expression de cette enzyme dans un modèle de souris développant une SLA permet de contrer ou de ralentir le développement de la maladie. Pour cette étude, des souris modèle de SLA exprimant ou non la PDK4 seront suivies d'un point de vue moteur et métabolique afin d'évaluer avec précision si le développement de la maladie est retardé en

l'absence de PDK4. Si tel est le cas, ces résultats permettront de confirmer que cette enzyme est une cible thérapeutique sérieuse pour le traitement de cette maladie incurable.

Dans ce projet, nous utiliserons au maximum 930 souris sur 5 ans.

Conformément à la règle des 3R, une attention particulière a été portée sur l'optimisation des protocoles afin de réduire le nombre d'animaux utilisés et d'améliorer et raffiner leurs conditions de vie.

Remplacement La SLA est une maladie d'origine multifactorielle et multicellulaire. Les cultures cellulaires ne permettent pas de modéliser l'aspect intégré de cette pathologie. Nous avons donc besoin de recourir à des modèles animaux qui présentent, en outre, une organisation du système nerveux proche de celle de l'homme pour réaliser ce projet de recherche.

Réduction Afin de réduire le nombre d'animaux dans ce projet, les animaux destinés aux analyses biochimiques ou histologiques seront au préalable inclus dans les études fonctionnelles. Le nombre de souris incluses dans ce projet tient compte des tests statistiques utilisés lors de l'analyse des résultats ainsi que de la variabilité interindividuelle de ces modèles génétiques. Les tests statistiques utilisés seront le test t de Student (non apparié) pour la comparaison de deux groupes expérimentaux ou des tests de comparaison de variance (ANOVA) suivis d'un test de Tukey pour la comparaison de plus de deux groupes expérimentaux.

Raffinement Les animaux auront accès ad libitum à l'eau et à la nourriture. Ils bénéficieront de conditions d'hébergement conformes à la réglementation en vigueur. L'enrichissement de l'environnement des animaux (bâtonnets à ronger, coton compressé pour faire des nids, maisons en plastique rouge), le maintien des interactions sociales et la surveillance quotidienne des animaux permettront de s'assurer de leurs bien-être et de détecter rapidement tout changement de comportement associé ou non à la pathologie étudiée afin qu'il puisse être pris en charge. Des points limites permettant de soustraire l'animal à la souffrance ont été établis. De plus, nous appliquerons également le principe de raffinement au niveau des méthodes de pré-anesthésie, d'anesthésie et de prise en charge analgésique pour les études électromyographiques.

15875 Ce projet de recherche fondamentale vise à mettre au point deux modèles *in vivo* de fuite capillaire afin de trouver des cibles thérapeutiques pour contrôler la perméabilité vasculaire au cours des états de choc chez l'homme.

Les états de choc constituent un enjeu de santé publique. Les admissions pour états de choc représentent un tiers des admissions en réanimation (environ 20.000 patients par an), et la mortalité associée reste de l'ordre de 40% actuellement. Il existe au cours des états de choc une fuite capillaire importante (fuite de plasma au travers des vaisseaux). Cette fuite capillaire est due à une augmentation de la perméabilité des vaisseaux du fait de l'activation de l'inflammation (syndrome de réponse inflammatoire systémique SRIS). Lorsqu'elle est généralisée, cette fuite capillaire aggrave l'insuffisance circulatoire du fait de la baisse du volume sanguin, et participe à l'apparition de lésions sur l'ensemble des organes (syndrome de défaillance multiviscérale). Le contrôle de la fuite capillaire s'est avéré très bénéfique dans plusieurs modèles de choc chez l'animal. Cependant, les déterminants de cette fuite capillaire au cours des états de choc restent très peu connus chez l'homme.

Dans un travail prospectif de recherche translationnelle entre un service de réanimation médicale et un laboratoire de recherche, nous avons isolé plusieurs protéines associées au syndrome de fuite capillaire chez 19 patients atteints de SRIS. Cette étude a permis d'identifier de nombreuses cibles d'intérêt. Pour étudier ces cibles, des modèles reproductibles de fuite capillaire sévère associée au SRIS sont nécessaires.

Notre objectif est de mettre au point deux modèles reproductibles de fuite capillaire chez l'animal afin de déchiffrer, dans un second temps, le rôle de ces différentes cibles sur la fuite capillaire au cours du SRIS.

Nous travaillerons sur deux modèles de SRIS induit chez la souris. Nous mettrons au point d'une part, un modèle de choc cardiogénique secondaire à un arrêt cardio-respiratoire et d'autre part un

modèle de choc septique après ligature-ponction caecale. Au total, 309 souris seront incluses dans l'étude sur une durée de 5 ans.

Ces protocoles ont été établis en prenant en compte la règle des 3 R « Remplacer, Réduire, Raffiner »

- Le nombre d'animaux a été réduit à celui requis pour une validité statistique des résultats. De plus, caractériser au mieux ces modèles permettra de calculer au préalable, à l'aide de tests de puissance pertinents, le nombre d'animaux nécessaires et ainsi de réduire au maximum le nombre d'animaux à utiliser dans les études futures.

- Dans un but de remplacement, des études préliminaires *in vitro* ont été réalisées. Cependant, ces conditions expérimentales ne sont pas satisfaisantes car elles ne permettent pas de reproduire les nombreuses voies physiologiques mises en jeu au cours du SRIS. La fuite capillaire est en effet d'origine multi-factorielle. Notre projet nécessite par conséquent le recours à un modèle animal, qui intègre ces différentes composantes physiologiques.

- Enfin, nous tendrons vers les objectifs préconisés de raffinement. Ces deux modèles murins de fuite capillaire secondaire au SRIS entraînent un état de choc chez l'animal, possiblement générateur d'inconfort. C'est pourquoi, il est prévu une surveillance rapprochée des animaux avec administration d'antalgiques en prophylaxie et en cas de besoin selon des grilles de bien-être certifiées. De même, les deux modèles seront réalisés sous anesthésie générale. De plus, les animaux seront hébergés dans les conditions usuelles d'un établissement certifié par le ministère de la recherche et validé par la structure bien-être de l'animal constituée au sein du centre de recherches.

En conclusion, ces deux modèles *in vivo* de fuite capillaire permettront d'avancer dans la connaissance des mécanismes physiopathologiques de la fuite capillaire pour in fine, traiter des malades graves.

15876 Le cerveau est constitué de neurones ainsi que d'un autre type cellulaire au moins aussi abondant appelé astrocytes. Alors que le rôle des neurones dans le fonctionnement cérébral est largement reconnu et étudié, le rôle des astrocytes et leurs interactions avec les neurones reste très largement méconnu. Néanmoins, les données récentes suggèrent qu'ils seraient aussi impliqués dans le contrôle des états comportementaux et des fonctions cognitives et dans certaines situations pathologiques. Une meilleure compréhension du rôle modulateur des astrocytes sur les activités neuronales améliorera donc notre compréhension du fonctionnement du système nerveux central en conditions normales et pathologiques.

Le manque d'outils nous permettant de cibler spécifiquement les astrocytes nous incite à nous tourner vers des modèles transgéniques chez qui l'expression de certaines molécules telles que les connexines, les pannexines, les canaux potassiques Kir4.1 ou encore le récepteur à l'inositol-3-phosphatase (et donc la signalisation calcique qui y est associé) est empêchée. Pour atteindre nos objectifs, nous utiliserons trois approches différentes :

- 1/ prélèvement de tissus et analyse biochimique et immunohistochimique des molécules d'intérêts
- 2/ évaluation par enregistrements électrophysiologiques *in vitro* du contrôle des activités neuronales par les réseaux astrocytaire (patch-clamp, field recording, calcium imaging, multi-electrode arrays)
- 3/ évaluation par analyse comportementale du rôle des astrocytes dans le contrôle des performances mnésiques

Pour mener à bien ce projet, qui s'étalera sur 5 ans, nous utiliserons 4180 souris s'inscrivant dans 6 procédures expérimentales. Le but final de ce projet étant d'étudier les interactions neurones-astrocytes d'un point de vue intégré, il nous est impossible de remplacer les enregistrements du cerveau intact par des simulations ou par des cultures de cellules du cerveau. Néanmoins, dans le but de réduire le nombre d'animaux nécessaires à ce projet, les approches d'injections de vecteurs viraux nous permettent de réduire le nombre de lignées qu'il est nécessaire d'élever, et donc le nombre de souris utilisées. De plus, ces approches virales permettent un contrôle temporel de l'inactivation des gènes étudiés, et donc de diminuer la souffrance (raffinement) liée aux troubles de

fonctionnement cérébral au cours du développement induite par ces modifications génétiques. Enfin, nous réduirons au maximum les techniques douloureuses ou stressantes par l'utilisation d'anesthésiques et d'analgésiques et veillerons au bien-être des animaux, en particulier après les procédures chirurgicales, afin de détecter tout indicateur de souffrance et déterminer si besoin l'arrêt de l'expérimentation et son euthanasie (point limite).

15877 Les saignements surviennent généralement suite à une lésion vasculaire traumatique et initient une réponse homéostatique appelée hémostase. Les plaquettes jouent un rôle majeur dans ce processus qui mène à l'arrêt du saignement. D'autres saignements, appelés spontanés peuvent survenir dans un contexte pathologique en présence d'inflammation. Certains de ces saignements peuvent être fatals notamment lorsqu'ils surviennent dans le cerveau lors d'un accident vasculaire cérébral.

Des travaux récents du laboratoire ont identifié un rôle d'un récepteur d'adhérence des neutrophiles dans le déclenchement des saignements inflammatoires. Comprendre les mécanismes impliquant les neutrophiles dans l'induction des saignements en conditions inflammatoires peut avoir des applications pour soigner des patients qui présentent des saignements lors d'une réaction inflammatoire.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'importance des intégrines des neutrophiles dans l'induction des saignements en conditions inflammatoires et de comprendre leur rôle dans les interactions entre neutrophiles et plaquettes.

Pour cela des animaux seront soumis à deux modèles d'inflammation cutanée locale, un modèle d'inflammation pulmonaire ainsi qu'un modèle d'accident vasculaire cérébral. Ces modèles sont complémentaires puisqu'ils permettent d'observer le phénomène au niveau de différents organes.

Remplacement : Le but de ce projet est d'évaluer l'importance des intégrines des neutrophiles dans l'induction des saignements en conditions inflammatoires et de comprendre leur rôle dans les interactions entre neutrophiles et plaquettes. L'inflammation au niveau cutané, pulmonaire et cérébral concerne essentiellement les vaisseaux sanguins, les membranes séreuses (thorax, abdomen, plèvre), le péricarde et la membrane synoviale. Les modèles *in vitro* ne sont pas assez sophistiqués pour appréhender toute la complexité générée par ces phénomènes intégrés.

Réduction : Le nombre d'animaux utilisés lors de cette étude est réduit au minimum, ce nombre étant fixé à 16 souris/groupe pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs.

Raffinement : Le stress et la douleur des animaux utilisés dans ce projet seront réduits au minimum

- Installation de l'animal sur une plaque chauffée à 38°C tout au long de l'anesthésie afin de lutter contre l'hypothermie, application d'un gel protecteur à la surface des yeux pendant l'anesthésie
- Anesthésie de l'animal pour toute procédure susceptible d'induire une douleur
- Injection d'analgésique pendant et après chaque procédure chirurgicale
- Les procédures seront de durée limitée entre 4 et 24 heures

Cette étude nécessitera au maximum l'utilisation de 448 souris.

15878 La dépendance aux opiacés est un problème majeur de santé publique. Des recherches sont entreprises pour identifier des traitements capables d'aider à l'arrêt durable de la consommation, notamment en réduisant les effets du sevrage et les risques de rechute. L'objectif de ce projet est d'évaluer des composés de l'industrie pharmaceutique pour leurs capacités thérapeutiques dans ces deux domaines. L'étude se fait au moyen de modèles validés chez le rat. L'avantage en est le contrôle strict de la consommation, ou exposition, préalable de drogue et des conditions d'application du composé.

Dans ce projet nous prévoyons d'utiliser un nombre total de 420 rats non-consanguins, sur une période de 5 ans. Cela correspond à une estimation de 5 expériences sur le risque de rechute (36 rats par expérience) et 5 expériences sur les effets du sevrage (48 rats par expérience).

Nous minimisons les contraintes liées à ce type d'études (chirurgies vasculaires, hébergement individuel) en portant une attention particulière à la mise en pratique des principes éthiques fondamentaux (principe des 3R Remplacement, Réduction, Raffinement).

Remplacement : Seul le modèle animal permet d'interroger les mécanismes neurobiologiques difficilement accessibles chez l'homme. De plus, l'étude du comportement addictif ne peut se réduire à la simple étude de l'effet de la drogue. Ce comportement met en jeu des mécanismes psychopharmacologiques complexes (conditionnement, perte de contrôle, impulsivité, compulsivité) qui ne peuvent pas être appréhendés par des modèles *ex vivo*.

Dans ce projet nous prévoyons d'utiliser un nombre total de 420 rats non-consanguins, sur une période de 5 ans. Le rongeur est en effet utilisé depuis 1960 pour modéliser la prise de drogue et la rechute du comportement au travers de la procédure d'autoadministration intraveineuse, pour modéliser les effets physiques et psychologiques du sevrage aux opiacés après expositions chroniques à la drogue.

Réduction : L'utilisation d'un trop grand nombre d'animaux est contraire à l'éthique, mais si trop peu d'animaux sont utilisés, l'expérience peut manquer de puissance statistique. Nous utilisons donc une méthode reconnue pour estimer le nombre minimum d'animaux nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement exploitables dans les études comportementales.

Raffinement : Pour définir les dommages et contraintes subis par l'animal, nous avons établi une grille d'évaluation clinique et de surveillance.

Pour réduire au maximum les conséquences de ces dommages, nous mettrons en œuvre les moyens suivants : enrichissement de l'environnement, soins pré-, per- et post-opératoires, manipulation quotidienne après l'intervention chirurgicale, phases d'habituation aux tests comportementaux et aux procédures d'administration des composés, manipulation et examen quotidiens ou bi-quotidiens, définition de points limites suffisamment précoces et mise en place de critères d'arrêt.

L'état de santé et l'attitude générale des animaux seront donc évalués individuellement une ou deux fois par jour. L'animal sera pesé au moins une fois par semaine.

15879 L'utilisation des ultrasons pour délivrer localement des molécules thérapeutiques au niveau d'un tissu pathologique cible est une stratégie en développement. Des résultats récents montrent que l'onde ultrasonore avec ou sans microbulle peut aussi induire une réponse cellulaire par un phénomène appelé mécanotransduction où la force physique de l'onde est transformée en réponse biochimique par la cellule par des mécanismes mal connus. C'est pourquoi, nous étudions maintenant la mécanotransduction ultrason-dépendante chez la souris. Le projet consiste à étudier la régulation du facteur de transcription Egr1 par les ultrasons avec ou sans microbulles grâce à un système rapporteur luciférase dont l'expression est contrôlée par Egr-1 dans une lignée de souris transgénique Egr-1-luc. Les microbulles de gaz sont agents de contraste échographique. Elles sont capables d'entrer en oscillation sous ultrasons et ainsi de stimuler mécaniquement les cellules du tendon. La protéine EGR1 est impliquée en particulier dans la réparation tendineuse. Après injection de luciférine, la souris Egr-1-luc permet de suivre *in vivo* par imagerie de bioluminescence de l'animal vivant et de façon non invasive l'activité transcriptionnelle après un traitement local et indolore aux ultrasons. La fonction du gène Egr1 sauvage est normale dans cette lignée, la lignée de souris transgénique Egr-1-luc présente donc un phénotype non dommageable non léthal avec une durée de vie et une reproduction normales. La protéine EGR1 est également impliquée dans différentes pathologies dont la réparation tendineuse que nous étudions. Notre modèle de lésion consiste en une section latérale partielle du tendon d'Achille. L'ensemble de cette procédure est réalisée de façon chirurgicale sous anesthésie et des anti-douleurs seront administrés. Plusieurs jours après cette lésion une stimulation ultrasonore sera réalisée pour évaluer l'effet de cette stimulation sur l'expression de la protéine EGR1 ainsi que son impact sur la réparation du tendon. Les paramètres de la stimulation ultrasonore réalisée seront comparables à un protocole utilisé actuellement en kinésithérapie chez l'Homme. Plusieurs stimulations ultrasonores seront réalisées dans le temps sur le même animal afin de favoriser les effets sur la réparation du tendon.

Notre expérimentation est conforme avec la règle des 3R

-L'utilisation de cette lignée EGR1-luc (utilisable en imagerie de bioluminescence) permettra d'analyser les résultats par imagerie sur animal vivant permettant donc de limiter le nombre de souris utilisées par rapport à des souris sauvages et mises à mort (réduire).

-Des points limites prédictifs ainsi qu'un protocole d'anesthésie et d'analgésie ont été mis en place (raffiner).

-Des études préalables *in vitro* ont été réalisées, cependant le système os-tendon-muscle nécessaire au projet ne peut être reproduit *in vitro* et nécessite l'utilisation de l'animal vivant (remplacer).

Durant les 2 années du projet, nous estimons utiliser un nombre total d'animaux de 147 souris Egr-1-luc. Ce projet s'inscrit dans la thématique de recherche de transfert de gènes par des méthodes non virales qui ont déjà fait l'objet de plusieurs autres demandes.

15880 La stéatohépatie non-alcoolique (Non-alcoholic Fatty Liver Disease ou NAFLD) est la manifestation hépatique du syndrome métabolique et l'une des maladies du foie les plus courantes dans les pays développés. Cette pathologie se réfère à un large éventail de dommages au foie, allant de la stéatose pure à une pathologie plus grave, à savoir la stéatohépatite (NASH) caractérisée, en plus de la stéatose, par une inflammation et une fibrose. La prévalence de la NAFLD augmente avec l'obésité morbide et le diabète de type 2. Etant donné l'augmentation épidémique de ces maladies métaboliques, il y a urgence à mieux comprendre ces pathologies au niveau cellulaire et moléculaire pour proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Les données récentes de la littérature suggèrent que le sulfure d'hydrogène joue un rôle important dans la physiologie et la pathologie du foie. Le sulfure d'hydrogène est une molécule de signalisation endogène chez les mammifères, biosynthétisé lors du métabolisme des acides aminés dans les tissus de l'organisme et par le microbiote intestinal. L'altération du métabolisme endogène du sulfure d'hydrogène est corrélée chez l'Homme avec les symptômes du diabète et de la cirrhose du foie. Il a été rapporté une diminution de la biosynthèse hépatique du sulfure d'hydrogène dans les modèles animaux de NAFLD. L'administration *in vivo* de molécules donneuses de sulfure d'hydrogène dans ces modèles a des effets bénéfiques sur la stéatose et l'inflammation hépatiques, mais les mécanismes impliqués ne sont pas élucidés.

L'objectif du projet est d'étudier *in vitro* 1/ l'impact du sulfure d'hydrogène sur le métabolisme glucidique et lipidique des cellules du foie (hépatocytes), 2/ les conséquences d'une modification du métabolisme du sulfure d'hydrogène sur l'homéostasie énergétique de ces cellules, et 3/ les mécanismes de régulation mis en jeu. Les études seront réalisées sur des cultures primaires d'hépatocytes de souris dans un environnement contrôlé. L'isolement des hépatocytes nécessite la dissociation du foie par perfusion enzymatique *in vivo*, après laparotomie. Pour cela, les animaux seront soumis à une anesthésie profonde pour empêcher toute souffrance. L'étape d'exsanguino-perfusion enzymatique entraîne la mort rapide de l'animal. Le foie, en grande partie dissocié, est donc prélevé post mortem, et les hépatocytes sont immédiatement récupérés et mis en culture. La durée totale de la procédure ne dépasse pas 15 min. Il n'est pas possible d'utiliser des lignées cellulaires établies car ce sont des cellules transformées en prolifération qui ont des caractéristiques métaboliques très différentes des hépatocytes *in situ*.

Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum mais suffisant pour permettre des analyses statistiques valables entre les différentes conditions expérimentales. De plus, les hépatocytes isolés à partir d'un seul animal seront utilisés pour tester plusieurs conditions expérimentales en parallèle, ce qui permet de réduire le nombre d'animaux utilisés.

Ce projet, qui implique un nombre total de 360 souris sur une durée de 5 ans, permettra de mieux comprendre les mécanismes de régulation du métabolisme énergétique hépatique contrôlés par le sulfure d'hydrogène et de proposer de nouvelles cibles moléculaires pour soigner les pathologies hépatiques de type NAFLD.

15881 Le système nerveux périphérique (SNP) est constitué des prolongements (appelés axones) des cellules nerveuses situées dans la moëlle épinière ainsi que des cellules de Schwann (SC) qui fabriquent la gaine protectrice entourant les axones, la myéline. La maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT) est l'une des maladies neuromusculaires les plus fréquentes et se distingue par une dégénération progressive, longueur-dépendante, du SNP. Les patients CMT développent des troubles de la marche associée à des troubles sensitifs. La maladie de CMT est également caractérisée par une forte hétérogénéité génétique et phénotypique, avec plus de 80 gènes connus pour être impliqués dans cette maladie. Celle-ci est aujourd'hui incurable.

Notre équipe de recherche a pour but d'identifier de nouveaux gènes responsables de CMT et ainsi que de mieux comprendre le rôle des protéines codées par ces gènes dans la fonction du SNP afin d'identifier des traitements pour cette maladie. Une nouvelle mutation dans le gène KCTD11 (Potassium Channel Tetramerization Domain Containing 11) a été récemment identifiée chez des patients atteints de la maladie de CMT. Cette dernière aboutit à la perte de la protéine.

Ce projet a pour but d'étudier un modèle de souris dont le gène *Kctd11* a été invalidé avec les objectifs suivants

- 1) Démontrer que la perte de KCTD11 provoque des anomalies du SNP responsables de la CMT
- 2) élucider les mécanismes moléculaires impliqués, en vue de trouver à plus long terme, un moyen de corriger l'effet des mutations.

Cette lignée de souris génétiquement modifiée a été développée par un fournisseur agréé de lignées de souris, mais n'a pas encore été évaluée au niveau du SNP. Ainsi nous évaluerons si la perte de *kctd11* entraîne un dysfonctionnement touchant le SNP conduisant à des troubles de la locomotion et de la sensibilité. Pour cela nous effectuerons quatre tests comportementaux sur 108 souris contrôles et transgéniques visant à explorer des paramètres affectés chez les patients CMT la locomotion, la démarche, la force musculaire, la sensibilité des pattes des souris ainsi que la mesure de vitesses de conduction nerveuse.

Nous appliquerons la règle des 3R :

- Remplacer il est difficile d'accéder aux cellules de patients et il n'existe pas de possibilité d'obtenir des cellules de Schwann humaines. Ce modèle nous permettra d'étudier ce type de CMT et de plus le passage au modèle *in vivo* est une étape indispensable avant d'envisager un essai thérapeutique chez l'homme.

- Réduire Le nombre d'animaux a été limité au minimum nécessaire pour mettre en évidence un effet significatif sur des paramètres de la locomotion, force musculaire et vitesse de conduction nerveuse. De plus, il s'agit d'une étude longitudinale, c'est-à-dire que les mêmes groupes de 36 animaux seront suivis à différents stades (3, 6, 12 et 18 mois) afin de déterminer à quel âge ils développent la maladie.

- Raffiner afin d'améliorer le bien-être animal au cours de notre étude, les besoins physiologiques des animaux seront respectés (nourriture à volonté, cages propres, enrichissement, stabulation en groupe). Des points limites clairs seront définis et les animaux seront mis à mort lorsqu'ils atteindront les critères d'interruption.

Cette étude sera réalisée sur trois ans dans un établissement utilisateur agréé et les souris seront manipulées et suivies par du personnel compétent. Les animaux seront hébergés dans des salles dont les paramètres d'ambiance sont contrôlés (température 22-24°C; renouvellement d'air 15 fois/heure éclairage artificiel 12h jour/12h nuit). Les souris seront maintenues par petits groupes de 3 à 5 dans des cages dont l'environnement est enrichi à l'aide de maisonnettes en carton. Les animaux feront l'objet d'une surveillance quotidienne afin de détecter précocement les points limites de souffrance.

Dans l'ensemble, ce projet nous permettra d'évaluer si la perte de KCTD11 est suffisante pour créer un dysfonctionnement du SNP et ainsi contribuer à l'émergence d'un nouveau modèle de CMT afin de mettre en place de nouvelles approches thérapeutiques pour ces patients.

15882 Les dispositifs médicaux implantables sont utilisés pour remplacer, suppléer, soulager une fonction et donc améliorer la santé.

Le lymphome anaplasique à grandes cellules (ALCL) est une pathologie nouvelle. Ce cancer se développe uniquement chez des patientes porteuses d'implants mammaires (esthétique ou après reconstruction du sein). En 2018, 656 ALCL ont été recensés (1). La physiopathologie de cette maladie découverte en 2011 reste inconnue. Les premières études supposent qu'une inflammation chronique autour des implants stimule les cellules T. Cette inflammation chronique entrainerait une transformation cancéreuse de ces cellules T aboutissant au ALCL (2,3). La contamination bactérienne lors de la pose initiale des implants pourrait favoriser le phénomène d'inflammation chronique.

L'inflammation autour d'un implant est lié à sa biocompatibilité. La biocompatibilité d'un matériau désigne sa capacité à être tolérée par un organisme vivant. Cette compatibilité est nécessaire pour que le matériau ne soit pas rejeté par le système immunitaire (4).

Un corps étranger implanté dans un organisme entraîne une réaction biologique avec la création d'une membrane biologique (encore appelée capsule). L'architecture cellulaire de cette membrane ressemble aux membranes entourant les articulations (5).

Le polyNaSS est un polymère bioactif. Ce polymère a déjà été testé avec succès sur le titane en condition expérimentale *in vitro* et *in vivo* chez l'animal avec une diminution de 70 % de l'adhésion des bactéries et une augmentation de la biocompatibilité (6). Une étude sur l'homme est actuellement en cours.

Nous allons réaliser une analyse comparative de la membrane biologique induite par des implants en silicone traités par le polyNaSS et des implants en silicone non traités (témoin) implanté dans le tissu sous-cutané des lapins. Une précédente étude sur le silicone traité par copolymère (ancêtre du polyNaSS) avait déjà démontré une diminution de l'adhésion bactérienne et une amélioration de la biocompatibilité *in vitro* et *in vivo* (7).

Les alternatives de remplacement : Les expérimentations fondamentales *in vitro* ont déjà été effectuées avec des résultats probants (6,6–8). Il est nécessaire de tester le nouveau polymère *in vivo* pour analyser la membrane biologique induite par le nouveau polymère greffé sur le silicone. Seul l'animal vivant peut simuler la formation de cette membrane. Le lapin est l'animal de choix permettant l'implantation d'implants mammaires identiques à l'Homme.

Les alternatives de réduction : Chaque lapin sera son propre témoin permettant de réduire au minimum le nombre d'animaux utilisés. Pour terminer l'étude 17 lapins seront nécessaires. Chaque lapin sera son propre témoin 15 implants greffés par polyNaSS seront introduits sur le côté droit et 15 implants non greffés sur le côté gauche. Les implants seront retirés après 45 jours et des prélèvements de la membrane biologique seront réalisés. Deux lapins supplémentaires sont prévus pour la maîtrise des techniques.

Les alternatives de raffinement : Prévention de la douleur

L'intervention aura lieu sous anesthésie générale.

L'injection sous cutanée d'un anesthésiant local de longue durée d'action (Ropivacaine) au niveau de la zone opérée va permettre une analgésie >12 heures de la zone opératoire.

Surveillance de la douleur

La douleur sera régulièrement évaluée en per et post opératoire par des critères cliniques tachypnée, polypnée, tachycardie et température. Le comportement de l'animal sera surveillé posture, mobilité, toilette, sécrétions nasales, la prise alimentaire, la réaction à la manipulation.

De plus, nous utiliserons la grille d'évaluation de la douleur (Annexe II) aidé par la grille adaptée aux lapins « Rabbit Grimace Scale » (Annexe 1) pour objectiver la douleur du lapin (9,10).

Traitement antalgique

Le traitement antalgique post-opératoire comprendra des AINS (Méloxicam 1 mg/kg) toutes les 12 heures en per os pendant 5 jours. Il pourra être associé une dose de Buprénorphine (0.05 mg/kg) administrée en sous-cutané toutes les 8 heures pendant les 48 premières heures. Il sera adapté en

fonction de la douleur. En cas de non contrôle de la douleur, la Buprénorphine sera remplacée par de la Morphine (1-2 mg/kg).

En cas de signe de douleur trop intense et non contrôlable, nous procéderons à la mise à mort anticipée de l'animal selon le protocole prévu.

Soins post-opératoires

Les plaies seront désinfectées quotidiennement. L'alimentation sera surveillée et en cas de difficulté alimentaire, un supplément mixé sera fourni aux lapins. La quantité d'eau bu par les animaux sera surveillée pour détecter un trouble du comportement. Les lapins seront enveloppés dans une couverture en post-opératoire afin d'éviter une déperdition de chaleur. La température ambiante sera contrôlée et surveillée pour assurer le bien-être des animaux.

15883 Les astrocytes, cellules gliales majoritaires du cerveau sont très ramifiées et leurs prolongements interagissent avec les vaisseaux sanguins et les neurones. A ces interfaces, les astrocytes régulent les fonctions vasculaires et neuronales. Notre laboratoire a récemment montré que les astrocytes régulaient ces fonctions en particulier grâce à la mise en place d'une synthèse locale des protéines. Ces mécanismes impliquent que les ARN messagers sont envoyés du soma des astrocytes vers leurs extrémités. Ils nécessitent un ensemble de protéines permettant de compacter les ARN, de les transporter, et de les traduire localement. Notre recherche a pour but d'identifier ces protéines et d'étudier leur fonction dans l'astrocyte. Dans ce cadre, nos travaux récents nous ont permis d'identifier que la protéine ARBP1 dans les astrocytes se lie à des ARN dans les prolongements astrocytaires perisynaptiques et perivasculaires. Arbp1 pourrait donc permettre de réguler la traduction locale dans les astrocytes. Nous souhaitons donc étudier le rôle de cette protéine dans les astrocytes en utilisant une lignée de souris où elle est absente des astrocytes. Dans ces souris, nous comparerons par rapport aux souris sauvages, la traduction locale des ARN et la morphologie de l'interface astrocytes/neurones et astrocytes vaisseaux sanguins.

Nos expérimentations se basent sur l'utilisation de la lignée Aldh1Cr^{Cre}2-Arbp1 fl/fl permettant d'inactiver Arbp1 uniquement dans les astrocytes par injection de tamoxifène, des prélèvements du cerveau après euthanasie des animaux pour l'analyse en biologie moléculaire et en biochimie, et pour les observations histologiques. Ces études seront réalisées à plusieurs stades (induction de l'inactivation chez le nouveau né ou chez l'adulte). Dans le cas de l'inactivation chez l'adulte, nous réaliserons aussi des expériences de "sauvetage moléculaire" en réinjectant Arbp1 dans le cerveau via des virus AAV injectés par des expériences de stéréotaxie. Ces protocoles ont tous été mis au point au laboratoire et adaptés aux études transcriptomiques, biochimiques et d'histologie. Ces protocoles ont tous optimisés et raffinés permettant de réduire à son minimum le nombre d'animaux à utiliser. Cette étude est menée sur la souris qui représente un très bon modèle d'étude du cerveau des mammifères. Il est irremplaçable pour notre étude car il n'existe pas de système *in vitro* reproduisant la morphologie complexe des astrocytes et leurs interfaces périvasculaires et périsynaptiques. Nous veillerons au bien-être des animaux, afin de détecter tout indicateur de souffrance et déterminer si besoin l'arrêt de l'expérimentation. Ce projet nécessitera un total de 948 souris. Il respecte les principes énoncés par les 3R (remplacement, réduction, raffinement). Cette étude permettra de comprendre les bases moléculaires de la traduction locale dans l'astrocyte et son rôle dans la régulation des fonctions vasculaires et neuronales.

15884 La grande majorité des *Escherichia coli* (*E. coli*) sont des commensaux de la flore intestinale humaine (microbiote) qui contribuent au maintien de l'homéostasie en participant à la digestion des aliments complexes et en empêchant la colonisation de l'intestin par des bactéries pathogènes. Cependant, certaines souches d'*Escherichia coli* pathogènes capables de sécréter des shiga-toxines, les STECs (Shiga-toxin producing *E. coli*), peuvent perturber cet équilibre suite à l'ingestion de seulement quelques dizaines d'entre elles et entraîner des colites hémorragiques aux conséquences parfois très graves pour leur hôte.

Bien que les adultes puissent être affectés par STEC (notamment dans le cadre d'épidémies ponctuelles, comme en Allemagne en 2011), ce sont majoritairement les enfants de moins de 5 ans qui sont touchés par les infections à STECs et qui sont les plus à risque de développer des

complications rénales extrêmement graves (15-20%), parfois létales (1-5%) le syndrome hémolytique et urémique (SHU).

De plus, aucune solution thérapeutique n'existe à ce jour pour soigner les patients atteints d'infections à STECs. En effet, les antibiotiques sont contre-indiqués puisqu'ils peuvent favoriser un relargage massif des toxines par les bactéries et ainsi aggraver la pathologie. Dans ce contexte, notre laboratoire développe une nouvelle génération d'antimicrobiens permettant d'éliminer spécifiquement les STECs dans l'intestin tout en évitant le relargage de toxines.

Dans ce contexte, nous utiliserons un modèle murin de colonisation intestinale à l'aide de souches d'*Escherichia coli* nous permettant de reproduire au mieux la situation observée chez les patients infectés par STEC. Bien que les tests *in vitro* soient essentiels pour valider la capacité de notre technologie à éliminer une population bactérienne particulière (ie. STEC), ils ne permettent pas de récapituler la complexité du tractus gastrointestinal chez l'Homme. Une démonstration de son efficacité dans une situation complexe chez l'animal est donc une étape essentielle afin de poursuivre notre développement vers une étude clinique. Le recours à l'animal est nécessaire afin de tester notre stratégie thérapeutique innovante dont l'efficacité a déjà été démontrée par des tests *in vitro* en laboratoire.

Les souches d'*Escherichia coli* n'étant pas des pathogènes intestinaux chez la souris, aucun désordre intestinal ne devrait se révéler au cours de ces expériences. En revanche, la sécrétion de toxines pourrait entraîner des complications rénales chez les animaux à l'instar de leur action chez l'Homme. C'est pourquoi, afin de réduire au maximum la souffrance animale, nous prévoyons d'utiliser, pour un maximum d'animaux, des souches d'*Escherichia coli* pour lesquelles les toxines auront été invalidées par génie génétique (KO).

Cependant, le principal objet de cette étude pré-clinique vise à valider la capacité de notre technologie à éliminer les STECs *in vivo* et à soigner les animaux infectés. De ce fait, nous ne pouvons nous restreindre à utiliser uniquement un modèle sans symptômes pour l'animal. C'est pourquoi, un suivi quotidien et minutieux sera organisé pour chaque animal infecté et des points limites seront établis afin de minimiser l'inconfort des animaux (les animaux atteignant ces points limités étant alors immédiatement mis à mort).

Dans ce projet, nous prévoyons d'utiliser un total de 1950 souris sur 5 ans. Les souris seront incluses dans cinq procédures distinctes (1360 souris dans 2 procédures modérées, 590 souris dans 3 procédures sévères). Dans le but de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisé tout en gardant un nombre suffisant pour une robustesse statistique, un bio-statisticien a été consulté afin d'évaluer nos besoins.

Les bénéfices attendus de ce projet pourraient être de premier ordre, car ils nous permettraient d'obtenir une stratégie efficace de lutte contre ces pathogènes sans pour autant affecter le reste du microbiote du fait de la spécificité de la technologie employée.

15885 Les terres rares sont des polluants émergents, utilisées dans les instruments de haute technologie tels que les affichages à cristaux liquides, les systèmes de communication ou encore les panneaux solaires. On les retrouve aussi utilisés pour d'autres applications, comme en médecine avec les agents de contraste utilisés en imagerie IRM, ou dans les batteries des moteurs de voitures électriques ou des smartphones. Ces utilisations humaines ont conduit à une augmentation croissante des concentrations de ces éléments dans l'environnement depuis une dizaine d'années, consécutives à diverses voies d'entrée environnementales (eaux usées et les effluents industriels). Les objectifs du projet sont doubles, ils permettront de disposer de données scientifiques utiles en recherche fondamentale, mais également de données précises essentielles aux gestionnaires. Les travaux entrepris permettront de comprendre les relations entre la présence des terres rares dans les écosystèmes aquatiques, liés aux utilisations humaines et industrielles, leur comportement dans l'environnement et leur impact sur les espèces aquatiques. Le poisson zèbre est un modèle biologique de choix en raison de sa sensibilité aux polluants environnementaux mais aussi en raison de similitudes moléculaires et physiologiques avec l'Homme. Son utilisation permettra, au travers de tests réglementaires et normalisés, de disposer de données scientifiques pour (1) évaluer le

risque environnemental des terres rares, (2) comprendre les effets de ces polluants émergents et les extrapoler à l'Homme et (3) définir des normes/seuils de rejets indispensables aux gestionnaires des masses d'eaux.

Pour la mise en œuvre des différents essais liés au projet 1520 poissons à différents stades de maturité seront utilisés 600 poissons adultes mâles, 120 juvéniles âgés de 4 à 5 semaines et 800 juvéniles issus de l'exposition de 800 œufs fécondés pendant 30 jours aux terres rares. Un nombre de 1680 œufs fécondés seront aussi utilisés pour l'étude de l'impact des terres rares sur le développement embryonnaire. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, notamment lors des essais d'écotoxicité normalisés, des essais limites seront menés, selon les recommandations de la ligne directrice OCDE 126 (2010). La concentration limite testée sera la valeur de CE50 la plus faible obtenue lors d'essais normalisés conduits sur algues et daphnies. En absence d'effets à cette concentration testée, il ne sera pas nécessaire de réaliser un test avec une gamme de concentrations. Toute difficulté à respirer caractérisée par une hyperventilation, un comportement de nage anormal (poisson qui reste dans le fond de la colonne d'eau, difficulté de nage) sera considéré comme une souffrance de l'animal. Après avoir été isolé, tout animal concerné par l'un de ces comportements persistants, c'est à dire depuis la constatation et confirmé une heure après la première observation sera mis à mort par surdose d'anesthésiant. Les poissons sont observés quotidiennement, l'apparition de de branchies rouges ou d'écaillés hérissées par exemple, synonymes de bactériose ou de la présence de champignons conduiront l'isolement de l'individu concerné et à sa mise à mort de l'individu. Une surveillance accrue des autres individus présents dans la même enceinte d'exposition sera mise en place.

Les résultats obtenus dans le cadre des essais d'écotoxicité normalisés permettront de définir les valeurs d'écotoxicité nécessaires au calcul du risque environnemental des terres rares testées. Il serviront également pour définir les concentrations utilisées dans le cadre des essais menés en rivières artificielles, ces concentrations devant être réalistes au regard des concentrations environnementales, afin de mettre en évidence d'éventuels effets des terres rares à plus long terme sur différentes espèces représentatives des écosystèmes aquatiques.

15886 Les maladies induisant des pertes de tissu osseux, comme les ostéosarcomes, les pseudarthroses ou encore l'ostéoporose, touchent un nombre croissant de personnes dans le monde et constituent un problème de santé publique majeur. A l'échelle mondiale, plus de deux millions de greffes osseuses sont réalisées annuellement afin de combler des défauts osseux en chirurgie orthopédique, neurochirurgie et chirurgie dentaire. De nombreuses solutions thérapeutiques existent actuellement pour favoriser la régénération osseuse, mais elles présentent toutes des limites et des risques (prélèvement site donneur, comorbidité, contamination, rejet de greffe...). Un des challenges majeurs de l'ingénierie tissulaire osseuse est de générer de nouveaux substituts osseux aux propriétés optimisées. Le développement et la validation des biomatériaux de reconstruction osseuse doit suivre plusieurs étapes successives, incluant des tests *in vitro* de biocompatibilité et de performance mais également des études *in vivo* permettant de mettre en évidence l'innocuité du produit ainsi que son effet sur la reconstruction osseuse. Il existe actuellement plusieurs modèles animaux validés pour l'évaluation des biomatériaux de substitution osseuse. Ces tests sont habituellement d'abord réalisés chez des rongeurs (souris, rat) qui présentent l'avantage d'être moins coûteux, plus simples à mettre en œuvre et plus reproductibles que les tests sur les gros animaux. L'objectif général de ces expérimentations est d'étudier l'influence du biomatériau sur la réparation osseuse. Pour cela, les biomatériaux seront implantés au niveau de défauts critiques de calvaria chez des rats et des souris. Les méthodes de caractérisation des biomatériaux implantés comprennent des évaluations cliniques (inflammation, douleur...), radiologiques et histologiques. Les évaluations radiologiques seront réalisées sur les mêmes échantillons que les prélèvements destinés à l'histologie en fin d'étude, après mise à mort de l'animal. Ainsi, pour obtenir un suivi de la cicatrisation au cours du temps, il est nécessaire de préparer plusieurs groupes d'animaux qui seront euthanasiés à des temps différents. Remplacement Il n'existe pas de modèle *in vitro* permettant d'étudier la réparation osseuse dans ce contexte. Réduction ces expériences sont conçues pour limiter le nombre d'animaux à 4 ou 8 par

temps et pour chacune des conditions expérimentales, en utilisant des tailles de groupes basées sur des travaux antérieurs et permettant des comparaisons statistiques. Du fait des expérimentations prévues lors des 5 prochaines années, nous envisageons d'utiliser 80 animaux par an (40 rats et 40 souris), soit 400 sur 5 ans. Raffinement une méthode d'analgésie des animaux en pré- et post-opératoire sera réalisée par injection de de Buprénorphine 30 minutes avant intervention, ainsi que le lendemain de l'intervention. Après l'intervention, les animaux seront replacés en fratrie avec des conditions d'hébergement et un milieu d'enrichissement adaptés, favorables au bien-être de l'animal (litière avec copeaux de peuplier, tuyaux pour jouer).

15887 Notre société veut proposer aux institutions publiques et privées la réalisation d'un modèle expérimental de glioblastome chez la souris. Incurable, le glioblastome est le cancer du cerveau le plus courant, sur lequel la recherche bute depuis des années. Son incidence progresse chaque année avec le vieillissement général de la population. Le modèle murin de glioblastome ne peut être remplacé par de l'expérimentation *in vitro*. En effet, l'intérêt est d'obtenir un modèle intégré complexe mimant au plus près la pathologie humaine. C'est le cas, les caractéristiques des tumeurs chez la souris sont similaires à ce que l'on retrouve chez l'humain (hypoxie de la tumeur, infiltrat tumoral, réactivité de la glie.) Les modèles que nous proposons permettront d'évaluer l'effet bénéfique ou délétère de composés pharmacologiques dans un contexte pathologique d'échec thérapeutique. Dans cette optique, nous proposons les modèles dans une activité de service, recherche pré-clinique sur des composés thérapeutiques, avec un nombre de 15 études par an, comprenant 80 souris par étude (correspondant à 1200 souris par an soit 6000 animaux en totalité).

Ces expériences seront réalisées dans les meilleures conditions éthiques en respectant la règle des 3Rs (Réduire, raffiner, remplacer) et conformément à la législation en vigueur. Le nombre d'animaux est de 10 par groupe pour obtenir des résultats statistiquement robustes et ainsi éviter de réitérer l'expérience. Afin de restreindre le nombre d'animaux, nous avons investi dans du matériel de haute technicité (cadre stéréotaxique de qualité) qui nous permet de manipuler les animaux dans les meilleures conditions de chirurgie et qui nous permettent d'obtenir une grande reproductibilité dans le modèle et ainsi de limiter le nombre d'animaux implantés. Pour éviter toute souffrance aux animaux, ils seront opérés sous anesthésie générale et analgésie pendant toute la durée de l'intervention et ils seront euthanasiés à la fin de la procédure. Les composés testés en traitement sur les animaux auront été préalablement testés *in vitro* par le client, pour déterminer les doses à utiliser et s'affranchir de la toxicité des composés. Les animaux participant à ces études seront traités selon différentes méthodes, propre à chaque client, comme des traitements par injection (intraveineuse, intrapéritonéale, intracérébrale) ou per os (gavage oral). Ils sont suivis pour leur poids, leur état général, la croissance tumorale. Pour cela, nous aurons recours à des techniques d'imageries qui nous permettront d'éviter le sacrifice des animaux et ainsi de faire des suivis d'un même animal sur toute la durée de l'étude. Certains groupes subissent du stress de contention afin de mimer l'état de stress du patient. Les animaux des études sont hébergés dans des conditions veillant au respect de leur bien-être (fratrie), sur de la litière en copeaux de peupliers et avec un milieu enrichi (jouet) afin de limiter leur stress. Les animaux sont suivis quotidiennement pour détecter tout inconfort ou souffrance, et de façon étroite en post-opératoire afin de soulager tout signe d'inconfort lié la procédure expérimentale. Une étroite collaboration entre le personnel de l'animalerie et notre équipe d'expérimentateurs permet d'intervenir immédiatement sur les animaux en cas de nécessité.

15888 Objectif du projet

Les troubles anxieux représentent les pathologies psychiatriques les plus fréquentes avec une prévalence de l'ordre de 16% de la population mondiale. Il est fondamental de mieux comprendre les circuits neuronaux et les mécanismes impliqués dans la régulation de ces pathologies dans le but de développer de nouvelles approches thérapeutiques. Au laboratoire, les troubles anxieux et en particulier les réponses émotionnelles de peur peuvent être facilement modélisés chez le rongeur par l'utilisation du conditionnement de peur qui consiste à associer un stimulus neutre appelé

stimulus conditionnel à un stimulus inconditionnel qui déclenche une réponse conditionnée de peur, de manière réflexe.

La réponse conditionnée peut facilement être quantifiée par la mesure du temps d'immobilisation du rongeur (temps que passe l'animal immobile, avec pour seul mouvement sa respiration) qui est un indice de la peur de l'animal. Le protocole de conditionnement à la peur, largement utilisé par la communauté scientifique pour l'étude des troubles anxieux, nécessite la délivrance de chocs électriques (3 au maximum au cours d'une unique session de conditionnement) au niveau des pattes des rongeurs. Les chocs électriques sont de faible intensité et de courte durée. La réponse conditionnée ne s'exprime que lorsque l'animal est exposé au stimulus conditionnel. Pour ce projet, nous allons utiliser le conditionnement contextuel l'animal est placé dans une cage différente de sa cage habituelle (visuellement et olfactivement) et un ou plusieurs chocs électriques de faible intensité et de courte durée (2 au maximum) seront délivrés dans cette cage au cours d'une unique session. L'animal associera donc ce contexte différent aux chocs électriques.

Le conditionnement contextuel consiste à placer une souris dans une cage de conditionnement (le contexte) qui sera différente de la cage de stabulation (forme de la cage, indices visuels, indices olfactifs...) et dans laquelle des chocs électriques de faible intensité et de courte durée seront délivrés au cours d'une unique session.

Dans ce projet, nous proposons d'étudier dans des modèles de troubles anxieux, l'efficacité de composés en développement sur les modifications des réseaux neuronaux. Pour ces études, des enregistrements électrophysiologiques ex-vivo (sur coupes cérébrales) permettront d'étudier les modifications du réseau neuronal induites par administration unique ou répétée de composés en développement par voie entérale (orale) ou parentérale (intraveineuse, intrapéritonéale, sous-cutanée, intramusculaire) sur un modèle de troubles anxieux.

Ce projet, d'une durée de 5 ans, nécessitera 505 souris (dont 5 souris dédiées aux actions de formation et de maintien de compétences).

Avantages : Ce projet scientifique associé à notre plateforme d'électrophysiologie (sur coupes cérébrales) permettra de mettre en évidence les modifications des réseaux neuronaux associés à des modèles animaux de troubles anxieux et de tester les effets neurotoxiques/neuroprotecteurs de composés en développement sur les modifications du réseau neuronal liées aux troubles anxieux. L'électrophysiologie est une technique très puissante qui permet l'enregistrement de l'activité électrique à l'échelle d'un réseau de neurones. Plusieurs paramètres électrophysiologiques peuvent être mesurés sur un même animal l'activité neuronale, la plasticité synaptique et l'activité oscillatoire.

Dommmages escomptés : Les chocs électriques sont de faible intensité et de courte durée, permettant ainsi de minimiser le stress induit tout en assurant des résultats robustes et reproductibles et en limitant ainsi le nombre d'animaux utilisés. La peur conditionnée, qui se développe suite au conditionnement de la peur, ne s'exprime pas à la suite du conditionnement, sauf en cas de nouvelle exposition au stimulus conditionnel.

Des points limites, adaptés à chaque mode d'administration, ont été préalablement définis pour le suivi suite à l'administration de composés et suite aux chocs électriques et permettront d'assurer un suivi de l'état général des animaux et de mettre en place des interventions précoces et adaptées en cas de souffrance animale. Une fiche de suivi sera mise en place pour s'assurer du bien-être de l'animal après le conditionnement.

Méthodes alternatives (principe de remplacement)

L'étude du système nerveux, de part sa complexité d'organisation, de développement et de fonctionnement, ne saurait être envisagée hors du contexte intégré retrouvé au sein de l'organisme entier. En ce sens, seules des approches menées chez un modèle animal, certes simplifié, peuvent améliorer la connaissance du cerveau humain et son développement, et ainsi aboutir au développement de nouvelles thérapies pour des pathologies psychiatriques. Nos expérimentations seront réalisées chez les rongeurs (souris), de petites tailles et d'élevage facile, qui possèdent un système nerveux dont le développement est extrêmement proche de celui du système nerveux humain, et dont l'organisation, certes simplifiée, est suffisamment complexe.

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

-réduction le nombre de souris utilisé a été réduit autant que possible, tout en étant suffisant pour l'obtention de résultats exploitables. Sur un même animal, nous pourrions enregistrer simultanément différents paramètres électrophysiologiques (plasticité synaptique, transmission synaptique de base, activité neuronale...). L'évaluation du nombre d'animaux nécessaire a été effectuée par l'utilisation du programme GPower 3.1. Les résultats seront analysés avec le logiciel GraphPad Prism. Nous adapterons les tests statistiques en fonction de la distribution des observables, qu'elle soit normale ou non.

-raffinement à leur arrivée, les animaux seront hébergés dans des cages collectives avec un environnement enrichi (nids végétaux, copeaux de bois à grignoter, contact visuel et olfactif entre les animaux, musique, commutation progressive de la lumière et interactions fréquentes avec les humains...). Boisson et nourriture seront disponibles ad libitum.

Dès la réception des animaux, une observation journalière sera mise en place. Des points limites préalablement définis et adaptés permettront d'assurer un suivi de l'état général des animaux (souffrance, stress, angoisse...) et ainsi de préserver leur bien-être. En cas d'altération de l'état de l'animal, la surveillance sera rapprochée et les animaux seront soignés en fonction de la sévérité de la douleur observée. Une évaluation rétrospective sera effectuée à la fin du projet.

15889 Le système nerveux central, dont fait partie le cerveau, est composé de plusieurs types cellulaires les neurones, mais également les cellules gliales dont les astrocytes. Ces derniers sont reconnus comme des acteurs essentiels à la physiologie et impactés dans de nombreuses pathologies. Ils interagissent notamment avec les vaisseaux sanguins où ils participent à la régulation des fonctions vasculaires, comme l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique. Ils forment ainsi avec les vaisseaux l'unité gliovasculaire, qui est perturbée dans l'ensemble des maladies touchant le cerveau.

Parmi les défis actuels en santé publique, les maladies liées au développement du cerveau, comme les troubles autistiques ou psychiatriques, ont une place importante. Cependant les étiologies de ces maladies sont encore largement méconnues. En particulier, un possible rôle des astrocytes reste à démontrer. Dans ce projet, nous étudions le rôle d'une protéine pouvant être impliquée dans le développement des astrocytes et en particulier dans la mise en place de l'unité gliovasculaire, en réalisant des caractérisations moléculaires (études transcriptomiques et biochimiques) et histologiques.

Ce projet nécessitera un total de 1100 souris. Il respecte les principes énoncés par les 3R (remplacement, réduction, raffinement). L'expérimentation animale sur un système murin est essentielle, car nous ne pouvons le remplacer par un système *in vitro* où il est impossible de recréer les multiples interactions cellulaires d'un système complexe en développement. Il n'existe pas non plus d'autres modèles à l'heure actuelle permettant de répondre à nos questions biologiques. Cependant, le nombre d'animaux utilisés sera réduit autant que possible et correspond au minimum nécessaire pour obtenir des résultats scientifiques significatifs. Les élevages sont effectués en groupe avec enrichissement de l'environnement et toutes les précautions sont assurées afin de respecter au mieux le bien-être animal. Les femelles subissant une opération feront l'objet d'une surveillance accrue pendant la procédure de chirurgie et les jours suivants.

Ce projet devrait permettre d'apporter un éclairage nouveau sur le rôle des astrocytes dans le développement cérébral, dont les défauts sont une cause importante de handicap cognitif et moteur.

15890 Les accidents vasculaires ischémiques cérébraux (AVC) sont la deuxième cause de mortalité dans le monde. La recanalisation de l'artère occluse est le seul traitement validé à la phase aiguë des infarctus cérébraux. Malgré la recanalisation de l'artère, des « lésions de reperfusion » participant au développement de l'ischémie cérébrale apparaissent dans environ 30% des cas. Les mécanismes sous-jacents sont complexes et impliquent un dysfonctionnement du vaisseau, l'activation des plaquettes sanguines et une réponse inflammatoire prononcée conduisant à la

rupture de la barrière hémato-encéphalique (BHE) et à la mort neuronale. Dans le contexte des lésions de reperfusion, nous proposons d'une part de caractériser l'activation plaquettaire, et d'autre part d'étudier l'efficacité et la tolérance de l'inhibition spécifique d'une protéine de la signalisation sur les lésions cérébrales post AVC. L'effet d'un estrogène sera également évalué. En effet, les données actuelles montrent que cet estrogène pourrait avoir des effets bénéfiques sur le vaisseau. Ceci devrait permettre de réduire les lésions de reperfusion post AVC sans majorer le risque d'hémorragie cérébrale.

Pour cette étude, nous réaliserons des AVC chez des souris contrôles, des souris génétiquement invalidées pour la protéine de la signalisation d'intérêt ou traitées avec l'estrogène d'intérêt ou avec un inhibiteur sélectif de la protéine de la signalisation impliquée dans l'activation des plaquettes et des cellules endothéliales. Des résultats préliminaires obtenus nous confortent dans notre hypothèse. Le nombre total d'animaux pour la réalisation de ce projet est de 360 souris. Cette estimation a été faite en tenant compte des résultats préliminaires qui nous ont montré que nous pouvons obtenir des résultats statistiquement corrects en faisant des groupes de 15 ou 30 souris selon la procédure réalisée. Ce projet devrait donc aider à une meilleure compréhension des mécanismes responsables des lésions de reperfusion, et identifier de nouveaux moyens thérapeutiques afin de préserver le vaisseau lors de la reperfusion de l'artère occluse post-AVC.

La formation d'une ischémie cérébrale ne peut être étudiée que sur l'organisme entier. Il n'existe pas de méthode alternative. En effet, les effets pléiotropes dans un contexte d'AVC font intervenir des fonctions et types cellulaires multiples non modélisables par des approches *in vitro*. Le recours à l'expérimentation animale est donc l'unique approche permettant de comprendre les impacts physiopathologiques dans ce contexte. Par ailleurs, nous travaillons avec des souris car celles-ci sont génétiquement modifiées et n'expriment plus la forme active de la protéine d'intérêt. Le traitement avec l'inhibiteur pharmacologique ou un estrogène est également réalisable sur ces rongeurs. Les expérimentations seront réalisées en accord avec la règle des 3R. Les expérimentations seront réalisées sur des souris anesthésiées et analgésiées (i) à l'isoflurane et traitées par injection intra-péritonéale avec du Tramadol post-opération ou (ii) par injection intra-péritonéale de zolétil et xylazine. Le nombre de souris sera réduit au minimum et les résultats obtenus par d'autres laboratoires ne seront pas reproduits. Selon les résultats que nous obtiendrons, certaines procédures peuvent ne pas être réalisées. Tout signal alarmant (prostration de l'animal, poil hérissé) sera pris en compte et l'animal concerné sera euthanasié.

15891 12 millions de personnes dans le monde souffrent d'un désordre moteur appelé spasticité. Il s'agit de contractions exagérées d'un muscle entraînant des troubles des mouvements et/ou de la posture qui peuvent être chroniques et douloureux. Ainsi, tout mouvement locomoteur devient difficile voire impossible les conséquences sont très invalidantes et peuvent aller jusqu'à la mise en danger de la vie des personnes. Sa prise en charge médicale repose sur des traitements dont l'objectif est soit de provoquer la relaxation musculaire, soit d'empêcher la stimulation du muscle par le nerf. Ainsi, les médecins utilisent les myorelaxants mais leur niveau d'efficacité reste faible. Les patients peuvent aussi être pris en charge par l'utilisation de la toxine botulique. Ce traitement est efficace mais n'agit qu'après quelques jours et doit être renouvelé régulièrement. Des recherches sont donc faites pour améliorer l'efficacité, la puissance, la rapidité et la durée d'action de ces traitements. Après une évaluation *in vitro* des nouvelles molécules, les plus prometteuses sont testées dans ce projet chez le rat, afin de valider leur efficacité et leur sécurité d'utilisation. Ce projet a pour objectif d'étudier l'effet de diverses molécules sur l'activité neuromusculaire en utilisant 3 méthodes complémentaires, largement décrites et utilisées la quantification de l'écartement spontané des doigts, la répartition du poids de l'animal sur ses pattes lors de ses déplacements libres et l'activité électrique musculaire selon une méthode proche de celle utilisée chez l'homme.

Dans le cadre du respect de la règle des 3R,

Remplacement aucune méthode de remplacement n'est disponible pour étudier la problématique du présent projet, la myorelaxation étant un phénomène complexe qui met en jeu plusieurs acteurs (muscles, nerfs...) et différents processus de contrôle. Néanmoins, les molécules testées

dans ce projet ont fait l'objet d'une sélection sur des tests *in vitro* afin de choisir celles qui ont le plus fort potentiel thérapeutique.

Raffinement le bien-être des animaux est primordial durant les expérimentations. Ainsi, un certain nombre de mesures sont mise en œuvre pour s'en assurer, comprenant l'inclusion d'une phase d'acclimatation (minimum 1 semaine) avant toute expérimentation, des conditions d'hébergement adaptées (maintien des animaux en groupe sociaux, respect de l'espace minimum pour chaque animal, accès à l'eau et à la nourriture à volonté), une observation quotidienne, une gestion de la douleur suivant une échelle stricte et des points limites bien établis.

Réduire nous cherchons toujours un compromis expérimental qui permet de réduire le nombre d'animaux utilisé. Par exemple, nous favorisons le test de plusieurs conditions expérimentales en parallèle (jusqu'à 10 groupes expérimentaux) afin de ne pas multiplier les groupes témoins.

En règle générale, chaque groupe expérimental d'un plan d'étude se compose de 8 animaux afin d'obtenir un résultat statistiquement satisfaisant.

Sur une période de 5 ans, l'utilisation de 1600 rats est envisagée. Cela nous permettra de tester jusqu'à 30

molécules au cours de 10 études.

15892 Les maladies rénales chroniques sont des maladies sévères avec un taux de mortalité de 10,6%. Elles résultent de la destruction progressive et irréversible des reins. Leurs causes sont diverses mêlant des facteurs génétiques, environnementaux et dégénératifs. Les complications associées découlent de la variété des fonctions remplies par les reins comme la filtration sanguine pour débarrasser l'organisme des déchets métaboliques. Les reins servent également à maintenir l'eau à un niveau constant dans le corps et à équilibrer les taux de sels minéraux comme le potassium, le phosphore ou le sodium. Ils produisent aussi des hormones, des enzymes et des vitamines indispensables à la fabrication des globules rouges, à la régulation de la pression artérielle et à la fixation du calcium.

En 2015, près de deux millions de patients étaient traités pour une insuffisance chronique rénale terminale correspondant à une perte de 85% de fonction des deux reins. Le nombre total de malades souffrant d'insuffisance rénale est cependant difficile à évaluer. La maladie reste silencieuse de nombreuses années et ne s'exprime qu'à un stade très avancé. On estime en effet que 10% de la population serait touchée sans le savoir. Sa prévalence augmente avec l'âge, notamment après 65 ans. Et chaque année le nombre de patients augmente de 2%, principalement chez les diabétiques et les personnes âgées de plus 75 ans, ce qui en fait un enjeu de santé publique majeur.

Arrivée au stade de l'insuffisance terminale, la fonction rénale doit être suppléée. Les thérapies préconisées sont alors une épuration du sang grâce à une dérivation extracorporelle - la dialyse - ou une transplantation rénale. Il s'agit cependant de thérapies particulièrement invasives et délicates à mettre en œuvre chez les sujets âgés. La mise en place de stratégies médicamenteuses plus légères est donc un axe principal de recherche sur les maladies rénales.

A ce titre, l'inhibition des récepteurs de la vasopressine V1a ou V2R sont de plus en plus reconnus comme des stratégies pharmacologiques prometteuses. Ces récepteurs sont activés par la vasopressine, une hormone antidiurétique sécrétée par l'hypothalamus, dont les taux circulants sont augmentés dans beaucoup de pathologies chroniques rénales. Cette augmentation est souvent corrélée à la sévérité de la maladie. Il est donc intéressant de développer des stratégies limitant les effets de cette hormone sur les reins. Afin de pouvoir évaluer minutieusement les effets d'antagonistes sur ses récepteurs V1a et V2R rénaux, il est nécessaire d'utiliser un modèle physiologique dépourvu de vasopressine tel le rat Brattleboro -HDS Blu : BRAT. Cette lignée présente une mutation dans le gène codant pour la vasopressine qui induit une déficience complète de cette hormone. L'effet biologique de molécules ciblant les récepteurs V1a et V2R peut alors y être étudié de façon pertinente. Les modèles cellulaires bien que permettant de réduire le nombre d'animaux utilisés ne sont pas privilégiés pour l'étude des pathologies rénales chroniques. En effet, ils ne reproduisent pas les échanges entre les différents types cellulaires et les différents organes.

Ces modèles cellulaires ne peuvent donc pas rendre compte des effets que pourraient avoir les antagonistes sur ses récepteurs V1a et V2R sur un organisme entier. Le recours aux modèles murins est donc indispensable à cette étude et pourra mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques.

L'objectif du présent projet est de maintenir en élevage des rats de la lignée Brattleboro et de produire des lots expérimentaux. Les animaux générés dans cette étude seront destinés à des études visant à développer des traitements contre les maladies chroniques rénales basés sur l'utilisation d'antagonistes des récepteurs à la vasopressine V1a et V2R tout en analysant les perspectives et limites thérapeutiques potentielles. Afin de satisfaire au raffinement, l'hébergement des animaux sera réalisé dans des locaux appropriés, avec un enrichissement systématique des cages (bâtons de bois à ronger et matériel de nidification) et un personnel habilité qui réalisera les différentes procédures en respectant les règles d'éthiques, le bien-être animal et le principe des 3R. Nos surveillances quotidiennes nous permettront d'identifier d'éventuels rats en souffrance et de prendre les mesures nécessaires (surveillance accrue, mise à mort dans les cas les plus graves). Pour pouvoir générer les lots requis pour cette étude et maintenir la lignée, nous estimons qu'un total de 6900 HSD Blu : BRAT est nécessaire sur 5 années de recherche.

15893 L'infarctus du myocarde représente la principale cause de mortalité à ce jour. Il est la conséquence de l'obstruction des artères coronaires. Celle-ci conduit à une ischémie tissulaire (manque d'oxygène) qui induit la mort des cellules contractiles du cœur puis une insuffisance cardiaque. Après l'ischémie, les cellules immunitaires sont recrutées en réponse aux chimiokines dans le cœur ischémique. La chimiokine CXCL12 et ses récepteurs CXCR4 et CXCR7 sont essentiels au développement du système cardiovasculaire et ont un rôle important dans les processus physiopathologiques tels que l'inflammation, l'angiogenèse, mais également dans le remodelage tissulaire suite à une ischémie.

La chimiokine citée exerce son rôle via sa liaison à ses récepteurs et aux héparanes-sulfates de la matrice extracellulaire. Des études sur des modèles expérimentaux d'infarctus ont montré que l'axe chimiokine/récepteurs est rapidement activé, cependant son rôle reste méconnu. Notre projet a pour but d'étudier, chez la souris, son rôle dans le remodelage et la régénération cardiaque post-infarctus.

La réponse tissulaire à l'ischémie est un phénomène complexe que des modèles *in vitro* ne peuvent pas recréer. Seule ces modèles *in vivo*, nous permettrons de comprendre le rôle de CXCL12 et de ses récepteurs dans le remodelage et la réparation consécutifs à une ischémie myocardique.

L'étude envisagée est très complète et étudie le rôle de cette chimiokine et de ses deux récepteurs par plusieurs procédés à la fois sur des souris adultes et des souriceaux issus de 7 lignées + les littermates de chaque lignée qui serviront de souris contrôles. C'est pourquoi ce projet devrait utiliser 13 760 souris génétiquement modifiées ce qui nous permettra d'analyser le rôle de ces interactions.

Ces animaux subiront un infarctus du myocarde puis sacrifiés à différents temps. L'analyse consistera à étudier la fonction cardiaque par échographie, le remodelage du tissu cardiaque par des analyses histologiques permettant d'analyser la structure du tissu et enfin la réponse inflammatoire, qui permettra de savoir quels types de cellules inflammatoires sont recrutés au niveau du cœur après l'ischémie.

Afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligée aux animaux, les procédures se dérouleront sous anesthésie et antalgiques avec une surveillance journalière. Enfin, des points-limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

A terme, les résultats de ce projet permettront de mieux comprendre le rôle de la chimiokine CXCL12 et de ses récepteurs dans le contrôle de l'inflammation associée à l'infarctus du myocarde et la régénération cardiaque. Ces résultats permettront le développement de nouvelles thérapies.

15894 Le sommeil représente un processus biologique universel et essentiel de la vie. Pourtant, les mécanismes de régulation des états de vigilances restent mal compris. L'insomnie, caractérisée par une diminution de la durée habituelle du sommeil et/ou une altération de la qualité du sommeil,

touche un tiers de la population occidentale et il n'existe toujours pas de traitement efficace contre l'insomnie, surtout sur le long terme. Pourtant, le manque de sommeil a des répercussions désastreuses sur la santé, favorisant l'apparition du diabète, de l'anxiété, de la dépression ou encore de la maladie d'Alzheimer.

La régulation du sommeil lent, qui correspond à la première phase du sommeil, est contrôlée par des neurones localisés au niveau du noyau préoptique ventrolatérale (VLPO), au sein duquel nos données préliminaires indiquent déjà que d'importants changements morphologiques des cellules de cette structure au cours des cycles veille/sommeil. En effet, nous avons récemment montré que les cellules grandissent au cours de la période de repos et rétrécissent pendant l'éveil. Or, il est actuellement bien établi que la forme des astrocytes influence l'activité des neurones. Ainsi des changements de forme des astrocytes dans le VLPO pourraient participer à la régulation du sommeil lent.

Les astrocytes humains étant beaucoup plus gros et complexes que ceux de la souris, ils établissent ainsi beaucoup plus de contacts avec les synapses et les vaisseaux environnants et pourraient donc conférer les propriétés si spécifiques du cerveau humain. Pour déterminer si la complexité structurelle et les propriétés fonctionnelles uniques des astrocytes humains pourraient potentialiser l'efficacité du réseau neuronal au sein du VLPO, nous testerons l'hypothèse selon laquelle la présence d'astrocytes humains améliorerait la qualité/quantité de sommeil. En parallèle, nous testerons également si en augmentant le nombre d'astrocytes, qui reste normalement stable au cours du sommeil, en greffant des précurseurs murins dans le VLPO de souris, le sommeil serait également modifié. Ainsi, nous implanterons des cellules gliales progénitrices humaines ou murines dans le VLPO de cerveau de souris et déterminerons dans quelle mesure l'efficacité du sommeil est accrue dans les souris chimériques.

Pour caractériser à quel point les astrocytes greffés se sont bien intégrés dans le tissu cérébral, des analyses histologiques ainsi que des enregistrements neuronaux et gliaux électrophysiologiques seront réalisés. Puis, des mesures d'électroencéphalographie (EEG) et d'électromyogramme (EMG) seront réalisées afin de déterminer les effets de la greffe sur le sommeil. Nous mesurerons notamment l'amplitude des ondes delta, caractéristiques de la qualité du sommeil et la durée des épisodes de sommeil, afin de déterminer un effet sur la consolidation du sommeil. Enfin, des expériences de privation de sommeil seront réalisées afin de déterminer les capacités de régulation homéostatique du sommeil des souris chimériques humaines comparées à celui des souris greffées avec des astrocytes humains.

De par l'incidence des troubles du sommeil chez l'homme, notre projet présente donc un intérêt scientifique et sociétal majeur. Nous proposons une approche nouvelle qui pourra être mise en œuvre grâce aux compétences et savoir-faire de notre laboratoire.

Dans ce projet de 5 ans, nous aurons besoin de greffer 504 souris immunodéficientes, 168 Gal-GFP et 168 GCaMP6 avec des astrocytes humains ou murins. De plus, il nous faudra 75 animaux pour la reproduction. Ainsi, nous aurons besoin au total de 915 souris.

Pour réaliser la greffe en limitant la douleur et en diminuant la contrainte imposée aux animaux, les procédures d'anesthésie et d'analgésie seront respectées rigoureusement au cours de l'expérimentation. Toutes les précautions sont assurées afin de respecter au mieux le bien-être animal. Les animaux seront suivis quotidiennement pour surveiller leur comportement. Pour tous les animaux un suivi régulier de leur alimentation, une présence de plaie ou si l'animal se gratte.

Tout animal montrant un problème de confort suite à la greffe sera mis sous surveillance accrue. Une attention particulière sera donnée si l'animal se gratte, présente une plaie, ou montre des signes de douleurs auquel cas il sera euthanasié.

Ce projet respecte les principes énoncés par les 3 R (remplacement, réduction, raffinement). Le nombre d'animaux utilisés sera minimisé autant que possible et correspond au minimum nécessaire pour obtenir des résultats scientifiques significatifs. Il n'existe pas non plus d'autres modèles permettant de répondre à nos questions biologiques. En effet nous ne possédons pas les outils génétiques, physiologiques permettant cette étude sur un autre modèle. De plus, comme des études ont déjà été effectuées sur la souris, il est plus judicieux d'utiliser ce même modèle afin

d'établir des comparaisons et de les compléter. Enfin, comme il s'agit d'une étude physiologique sur l'activité des cellules il est impossible d'étudier ceci sur un modèle *in vitro*, car notre étude nécessite forcément d'étudier les phénomènes d'intérêt dans l'organe d'origine.

A la fin des expériences *in vivo*, les cerveaux seront prélevés, après euthanasie, afin de réaliser des contrôles histologiques ou des enregistrements électrophysiologiques et pour vérifier les localisations et intégrations des cellules greffées.

15895 Le projet porte sur les leucémies (cancer des cellules de la moelle osseuse et du sang) présentant la mutation d'un gène retrouvée très fréquemment dans les cellules leucémiques. Des études récentes ont montré qu'elle pouvait conférer une sensibilité à différents agents thérapeutiques. Nous nous attacherons à comprendre comment ces traitements agissent sur ces leucémies en particulier et quels sont leurs effets sur la protéine mutante. Les études préalablement menées *in vitro* nous ont fourni des résultats prometteurs pour mieux comprendre ces mécanismes. La poursuite d'études *in vivo* afin de mieux comprendre les voies d'actions de ces médicaments, d'optimiser leur posologie et de tester leur combinaison demeurent indispensables pour tenter d'améliorer les conditions thérapeutiques, tout en se rapprochant des situations retrouvées chez les patients. Les animaux utilisés seront des souris qui, après irradiation sublétales pour faciliter et homogénéiser la prise de greffe entre individus, seront greffées par injection intraveineuse de cellules leucémiques afin de reproduire la leucémie humaine. Elles seront ensuite traitées ou non par différents agents thérapeutiques administrés quotidiennement sur toute la durée de la procédure soit par voie orale, injections intraveineuses ou intra-péritonéales sur animaux vigiles, soit par implantation d'une capsule-médicament directement sous la peau en une seule intervention. La chirurgie sera réalisée sous anesthésie générale accompagnée d'une analgésie adaptée. Les injections seront réalisées sans anesthésie. Les agents thérapeutiques administrés ont déjà fait l'objet d'études antérieures démontrant l'absence de douleurs associées aux doses utilisées. Ils sont tous déjà utilisés chez les patients en clinique.

Ce projet et la constitution des groupes d'animaux seront réalisés en accord avec la règle des 3R. Nous avons au préalable testé nos molécules d'intérêts *ex vivo* sur un maximum de modèles cellulaires cultivables en laboratoire (cellules isolées à partir de patients, cellules souches embryonnaires);

Les groupes d'animaux seront réduits au minimum après estimation des effectifs basée sur les données antérieures du laboratoire et une simulation statistique afin de garantir l'obtention de résultats statistiquement recevables. Nous utiliserons au maximum 1560 souris sur les 5 ans que durera le projet.

Les animaux seront hébergés en groupe pour respecter leur comportement grégaire. Nous aurons recours à l'anesthésie/analgésie pour toute intervention le nécessitant. Une grille d'évaluation de leur comportement sera tenue et différents critères seront scorés de façon à définir des points limites de douleur/souffrance suffisamment précoces pour déclencher le recours à l'euthanasie si ces points limites étaient atteints et qu'aucun traitement n'interférant pas avec l'expérimentation menée ne pouvait y remédier.

Les procédures n'excéderont pas 5 mois dans la grande majorité des cas et pourront aller jusqu'à 2 ans lors des quelques expériences de survie après traitement. Les souris seront systématiquement euthanasiées en fin de procédure.

15896 L'insuffisance cardiaque est une maladie fréquente, chronique, et fortement invalidante. Elle expose les millions de patients atteints à une limitation de la vie quotidienne et à des ré-hospitalisations fréquentes. Les traitements actuels luttent contre les symptômes de l'insuffisance cardiaque mais il n'existe pas de traitement permettant d'améliorer directement la constitution du muscle cardiaque, en limitant notamment la perte de muscle et son remplacement par un tissu fibreux incapable de se contracter. De plus, la perte progressive de la vascularisation du muscle cardiaque contribue à entretenir et à aggraver l'insuffisance cardiaque.

Ce projet cherche à mieux comprendre les mécanismes régulant le développement de la fibrose cardiaque (dit fibrogénèse) et des vaisseaux cardiaques (dit angiogénèse) aux dépens du muscle cardiaque. Plusieurs éléments laissent en effet à penser que la régulation du niveau d'oxygène au niveau de cœur favorise l'un ou l'autre de ces processus, notamment via une régulation du stress oxydant induit naturellement par l'oxygène. Dans ce projet, nous cherchons à identifier les éléments qui orientent les cellules cardiaques vers la fibrogénèse ou l'angiogénèse et ceci afin d'éviter ou de retarder les complications cardiaques liées à la fibrose cardiaque et donc le développement de l'insuffisance cardiaque. Ce projet a pour but d'étudier des phénomènes cardiaques pathologiques pour lesquels les méthodes alternatives actuelles sont insuffisantes. Les modèles cellulaires ne peuvent refléter la complexité de la pathologie humaine. Les modèles chez la souris restent donc les meilleurs pour étudier ces processus.

La souris est un modèle de choix pour l'étude de l'ischémie myocardique. En réponse à une ischémie, le cœur de la souris développe en effet des modifications de sa structure et de son contenu qui sont très proches de celles observées chez l'homme. Il existe notamment un remplacement du muscle par un tissu fibreux et une perte de la vascularisation du muscle cardiaque.

Des données récentes dans la littérature montrent que des conditions hypoxiques améliorent la régénération cardiaque chez la souris. Nous faisons l'hypothèse qu'une hypoxie systémique graduelle pourrait favoriser des mécanismes plus favorables à une réparation myocardique appropriée.

Dans le cadre de l'exigence des 3R, nous développons des approches alternatives consistant à créer des organoïdes cardiaques, dérivés de cellules souches pluripotentes induites humaines, et qui permettent de fournir des informations sur la contractilité et la relaxation cardiaque sans recourir à des modèles animaux. Cependant ces modèles sont insuffisants pour reproduire la fonction cardiaque complète.

Le nombre total de souris nécessaires à la réalisation de ce projet est de 720 pour une durée de 4 ans. Les différentes procédures expérimentales ont été consciencieusement pensées et définies afin d'utiliser le moins d'animaux possible tout en nous permettant d'obtenir des résultats statistiquement exploitables. La taille des échantillons permettant une analyse statistique efficace des résultats a été calculée grâce aux données collectées au cours d'expériences précédentes.

Ce projet met en jeu une procédure simple de placement des animaux dans des cages où la teneur en oxygène peut être contrôlée pour créer une hypoxie chronique, équivalente à une vie en altitude. Pour éviter toute souffrance, angoisse ou stress, les animaux sont régulièrement surveillés et une grille d'évaluation des points limites est mise en place et utilisée pour activer les mesures d'accompagnement améliorant le bien-être de l'animal. Tout signe de douleur, de souffrance, d'angoisse ou de stress chez les animaux sera soulagé avec des analgésiques.

A terme, les résultats de ce projet permettront d'identifier une nouvelle cible thérapeutique limitant le développement de la fibrose cardiaque. Ces résultats pourraient conduire au développement de nouveaux traitements adaptés pour des millions de patients souffrant d'insuffisance cardiaque.

15897 L'accident vasculaire cérébral (AVC) de type ischémique résulte d'une occlusion transitoire ou permanente d'une artère cérébrale. Selon l'organisation mondiale de la santé, les AVC représentent la deuxième cause de mortalité dans le monde. De plus, l'impact socio-économique de cette pathologie est très important car en l'absence de traitement efficace, une grande partie des patients qui survivent à l'attaque, reste handicapée. Aujourd'hui, la thrombolyse et la thrombectomie pour restaurer la perfusion sanguine cérébrale sont les seules gestes thérapeutiques efficaces en phase aiguë. Lors de la phase chronique, dans les semaines qui suivent l'AVC, seule la physiothérapie est proposée pour optimiser la récupération fonctionnelle. En somme, il n'y a aucun traitement pharmacologique destiné à accélérer ou amplifier la reconstruction des réseaux de neurones qui ont été endommagés.

Les études conduites au sein de notre équipe ont démontré qu'une endozépine (Peptide E) améliore la récupération fonctionnelle chez la souris ischémiée. Cependant, le mécanisme par lequel ce

peptide agit, n'est pas clair. Notre hypothèse est qu'il agit comme un booster de l'excitabilité des territoires corticaux en réparation, plus précisément en corrigeant l'excès d'inhibition. Ce projet vise donc à caractériser l'effet de ce peptide sur l'activité des neurones de la zone en réparation (cortex peri-lésionnel).

Ce projet prend en compte le bien-être de l'animal et les pratiques éthiques, et s'efforce de réduire le nombre d'animaux au strict nécessaire pour que l'étude soit conclusive (177 souris mâles adultes), en collectant le maximum d'observations au cours d'une même expérience. Ce projet concerne l'activité du cerveau après une pathologie complexe les données recueillies sont impossibles à générer sans le recours à la recherche animale. Les principes éthiques et les standards de raffinement sont appliqués jusqu'à la mise à mort de l'animal. Toutes nos procédures seront réalisées sous anesthésie générale associée à un analgésique permettant d'inhiber la douleur et le stress des animaux. Les animaux auront accès à l'eau et la nourriture ad libitum et ils seront sous surveillance constante après le déclenchement de l'AVC expérimental. Il n'y aura en revanche pas de réveil après les enregistrements cérébraux, intégralement réalisés sous anesthésie générale. Nous utiliserons la souris comme modèle car la souris est le mammifère non primate le plus proche de l'homme (phylogénétiquement) et d'autre part, la physiopathologie de l'AVC est très bien décrite chez cet animal.

15898 Les cellules souches cancéreuses (CSC) constituent le moteur de l'évolution tumorale. Elles possèdent la capacité de résister aux chimiothérapies, régénérer la tumeur primaire et sont impliquées dans le développement métastatique. Pour cette raison, il est devenu indispensable d'identifier leurs points faibles et de développer de traitements appropriés.

Nous avons récemment identifié une enzyme dont l'activité régule les capacités « dangereuses » inhérentes aux CSC. Nos données préliminaires ont été obtenues *in vitro* sur plusieurs lignées de cancer colorectal. Nous souhaitons à présent déterminer si l'activité de cette enzyme intervient dans l'initiation et la progression tumorale *in vivo*. L'objectif à terme est de déterminer si cette enzyme pourrait devenir une cible potentielle pour le traitement du cancer colorectal.

Les expériences proposées n'ont jamais été réalisées au préalable (ni dans l'équipe, ni dans aucune publication à notre connaissance). Elles sont essentielles à la validation des résultats obtenus *in vitro*.

Cette étude sera réalisée dans le cadre de la règle des 3R :

"Réduire" : le nombre d'animaux a été réduit au minimum après calcul de l'échantillonnage nécessaire afin d'obtenir une puissance statistique satisfaisante

"Raffiner" : des mesures destinées à réduire la contrainte, la douleur et la souffrance des animaux ont été prévues (enrichissement du milieu à l'aide de litière mélangée à des copeaux ainsi que de briques de peuplier, suivi régulier des animaux, injection d'analgésiques en cas de douleur, ...)

"Remplacer" : la majorité des expériences fonctionnelles sera réalisée *in vitro* à partir de lignées humaines établies à partir d'échantillons de patients, limitant ainsi au maximum l'utilisation du modèle murin.

Pour l'ensemble de ce projet, nous avons prévu un nombre de 220 souris sur une durée de 3 ans.

15899 Les Lymphomes B Diffus à Grandes Cellules (LBDGC) sont des cancers du système lymphatique (ensemble de cellules immunitaires qui assurent la défense de l'organisme contre divers pathogènes) à prolifération rapide, les plus fréquents dans les pays industrialisés. Les LBDGC sont hétérogènes au niveau moléculaire, une diversité qui explique pourquoi 40% des patients sont résistants (ou répondent faiblement) à l'immunochimiothérapie. Devant le peu d'alternatives thérapeutiques disponibles pour traiter les patients réfractaires, il est évident qu'il faut mobiliser nos efforts de recherche.

Nous avons récemment identifié un traitement conduisant à des régressions tumorales chez des patients atteints de LBDGC, réfractaires à l'immunochimiothérapie. Ce traitement, déjà disponible en clinique pour traiter les leucémies chez l'enfant, vise la production énergétique des cellules tumorales. L'énergie cellulaire est produite par toutes les cellules de mammifères en division et

fonctionne comme un carburant. Les cellules tumorales se caractérisent par une production d'énergie exacerbée qui leur permet d'assurer une division rapide et incontrôlée. Nous avons ainsi montré qu'en exploitant cette caractéristique, nous pouvions réduire la taille des lymphomes B à des stades avancés de la maladie, ce qui représente un espoir thérapeutique considérable. C'est grâce à l'utilisation d'un modèle murin de genèse spontanée du lymphome B qui partage de nombreuses caractéristiques semblables à celles des LBDGC humains, que l'efficacité anti-tumorale de ce traitement a été validée.

Cependant, en dépit des régressions tumorales observées en clinique, 100% des patients ayant reçu ce nouveau traitement ont rechuté. Ceci suggère la présence de cellules résiduelles capables d'adaptation(s). Chez la souris, nos résultats préliminaires montrent un échappement des cellules tumorales au traitement, en raison de l'utilisation d'un nouveau mécanisme de production d'énergie. En effet, les cellules de mammifères ont à disposition différents réseaux de production d'énergie, appelés « voies métaboliques ».

Notre objectif est d'empêcher la reprogrammation métabolique qui a lieu au cours du traitement, en ciblant, spécifiquement, ces voies métaboliques dérégulées. Nous souhaitons ainsi proposer une alternative thérapeutique pour maintenir un effet durable du traitement initial, sans rechute. L'activation des voies métaboliques est un phénomène influencé par l'organisme en général et par l'environnement au contact de la tumeur (les vaisseaux sanguins modulent l'apport en oxygène et en nutriment) en particulier. C'est une des raisons pour laquelle cette étude ne peut pas être menée à l'extérieur d'un organisme vivant (comme des cellules tumorales isolées *in vitro*). Pour cela, nous travaillerons à partir d'un modèle murin de lymphomes B spontanés avec lequel nous avons précédemment acquis une grande expérience. Grâce à différents outils chimiques et moléculaires, les voies métaboliques dérégulées seront bloquées et l'efficacité anti-tumorale qui en résulte sera évaluée sur le développement du lymphome et sur ses caractéristiques cellulaires, moléculaires et métaboliques.

Ce projet prend en compte les recommandations concernant les moyens à mettre en œuvre pour réduire l'utilisation des animaux (règle des « 3R »)

- Le métabolisme tumoral *in vivo* est profondément différent de celui observé *in vitro*. Malheureusement, il n'existe pas à ce jour d'autre alternative à l'expérimentation animale pour étudier *in vivo* des mécanismes moléculaires et métaboliques impliqués dans l'échappement des cellules tumorales aux thérapies proposées (Remplacement).

- Pour réduire au minimum indispensable le nombre d'animaux utilisés, tout en garantissant l'obtention de résultats robustes d'un point de vue statistique, nous avons utilisé le logiciel de prédiction statistique (GPower) (Réduction). De plus, les animaux transgéniques générés (mâles et femelles) seront tous utilisés et cela nous permettra de maintenir l'élevage à bas bruit (Réduction). Lorsque les animaux devront être traités avec deux molécules simultanément, le nombre de groupe témoin sera réduit de deux (un groupe témoin par traitement) à un seul.

- Enfin, l'amélioration de certaines procédures sera possible dans le cadre de deux traitements administrés simultanément. Dans ce cas précis, les molécules seront mélangées pour pratiquer une seule injection au lieu de deux, lorsque ceci sera techniquement possible (solvant et voie d'administration identiques) (Raffinement).

Enfin, les animaux seront manipulés par le personnel formé qui assurera leur bien-être, et limitera leur stress et douleur en mettant en application des points limites précis précoces et adaptés au modèle murin utilisé et à la pathologie du lymphome.

Ce projet qui prévoit l'utilisation de 3830 souris, est soutenu financièrement par des organismes de recherche publics et privés.

15900 La radiothérapie (et plus particulièrement la protonthérapie) est une des options thérapeutiques les plus importantes dans le traitement des cancers. Initialement développée pour les tumeurs de l'œil et les tumeurs intracrâniennes, la protonthérapie connaît une forte évolution dans le monde avec un élargissement des indications, en particulier en pédiatrie en raison de la diminution du risque de séquelles. Cependant, l'état actuel des connaissances est insuffisant pour répondre à de

nombreuses questions concernant les effets secondaires de la protonthérapie. En effet, ceux-ci sont encore peu étudiés, notamment en terme de lésions aux tissus sains environnant la tumeur.

De nouveaux protocoles, combinant la radiothérapie à des molécules pharmacologiques sont actuellement à l'étude. Une de ces molécules, l'Olaparib, pourrait potentialiser les effets toxiques de la radiothérapie sur les cellules cancéreuses en empêchant leur réparation. Comme pour la radiothérapie seule, la toxicité de cette combinaison sur les tissus sains reste à déterminer car celle-ci n'a été que très peu étudiée et encore moins *in vivo*.

Dans cette étude nous proposons d'évaluer la toxicité *in vivo* aux tissus sains des traitements combinés Olaparib + Radiothérapie et de fournir ainsi des données manquantes à l'heure actuelle dans la littérature qui pourront améliorer la prise en charge des patients.

Pour atteindre cet objectif, les souris seront irradiées en corps entier et traitées par Olaparib en administration orale.

Des études préalables ont été réalisées à partir de modèles mathématiques puis sur des cellules en culture pour fixer les modalités d'irradiation qui seront utilisées pour ce projet. Il est maintenant nécessaire de poursuivre ces études dans un modèle vivant, intégré et autonome comme la souris.

Le nombre de souris intégrées dans l'étude a été statistiquement défini de façon à obtenir des résultats fiables avec des effectifs réduits. Les souris seront suivies par des méthodes d'imagerie non invasives qui vont permettre un suivi longitudinal, sans euthanasie séquentielle des souris.

60 souris seront nécessaires à l'étude.

Les souris seront hébergées dans un environnement contrôlé en continu, avec un enrichissement adapté à leur espèce. Une période minimale de 7 jours sera respectée entre l'arrivée des souris et l'application des procédures expérimentales pour leur permettre de s'acclimater à leur nouvel environnement et ainsi limiter leur stress.

Des effets indésirables sont attendus, leur étude est l'enjeu même de ce projet. C'est pourquoi les souris seront étroitement suivies. Une grille de score a été établie pour fixer de façon objective les critères qui conduiront à l'arrêt immédiat de l'étude.

15901 La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est la première maladie des motoneurones, des cellules chargées de porter « l'ordre » du mouvement depuis le cerveau vers les muscles. C'est une maladie aujourd'hui incurable qui touche en France 6000 patients avec une incidence de 3 nouveaux cas par jour. Elle est caractérisée par une paralysie progressive qui entraîne la mort du patient dans les 3 à 5 ans suivant le diagnostic.

Les cellules de soutien des motoneurones sont aussi affectées dans cette maladie. Ces cellules sont sensibles aux variations d'une hormone, la leptine. Or le taux de leptine est diminué chez les patients SLA. Ce projet cherche à identifier le lien de causalité entre la diminution du taux de leptine circulante chez les patients et l'altération fonctionnelle des cellules de soutien des motoneurones chez des souris malades.

Pour cela, nous allons étudier la localisation, l'abondance et l'expression des récepteurs à la leptine aux stades présymptomatiques et symptomatiques de la maladie dans les cellules de soutien des motoneurones chez des souris malades.

Nous espérons ainsi mettre en évidence une cause de la dégénérescence de ces cellules de soutien et des motoneurones dans la SLA et potentiellement identifier une nouvelle piste thérapeutique pour stopper ou ralentir cette dégénérescence.

Afin de respecter la règle des 3R, nous avons d'abord procédé à des études préliminaires bioinformatiques sur des données mises en ligne, pour remplacer au maximum l'utilisation d'animaux vivants mais la complexité de la maladie, l'implication de différents types cellulaires et le besoin de corrélérer nos observations à l'apparition des symptômes exigent de travailler sur un modèle vivant.

Afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés, nous avons déterminé le nombre minimal nécessaire permettant d'obtenir des résultats significatifs, en prenant en compte la variabilité

interindividuelle des animaux et les tests statistiques qui seront utilisés lors de l'analyse des résultats dans ce projet nous utiliserons donc au maximum 87 souris.

Afin d'assurer leur bien-être, les animaux auront accès ad libitum à l'eau et à la nourriture et bénéficieront de conditions d'hébergement conformes à la réglementation en vigueur. L'enrichissement de l'environnement des animaux (bâtonnets à ronger, coton compressé pour faire des nids, maisons en plastique rouge), le maintien des interactions sociales et la surveillance quotidienne des animaux permettront de s'assurer de leurs bien-être et de détecter rapidement tout changement de comportement associé ou non à la pathologie étudiée afin qu'ils puissent être pris en charge. Des points limites permettant de soustraire l'animal à la souffrance ont été établis.

15902 La tomographie par émission de positons (TEP) est une technique d'imagerie médicale non invasive et très sensible qui repose sur l'utilisation de molécules radioactives (radiotraceurs) et qui contribue au diagnostic et/ou suivi de nombreuses pathologies cancéreuses. Cependant, pour permettre la détection précoce de ces pathologies cancéreuses, ces radiotraceurs doivent avoir une grande sélectivité tumorale. Des radiotraceurs de nouvelle génération ont donc été développés par assemblage moléculaire d'un isotope radioactif (dans notre cas le Fluor-18 ou le Gallium-68) et d'une entité vectrice comme des peptides, spécifiques de récepteurs surexprimés par les cellules cancéreuses.

Le but de ce projet est de déterminer le potentiel de nouveaux radiotraceurs développés en collaboration avec des radiochimistes sur des modèles de tumeurs cérébrales humaines.

L'imagerie TEP sera réalisée sur des souris femelles immunodéficientes (nude) porteuses de tumeurs humaines (cellules U87-MG) implantées sous la peau (6 souris par an au maximum soit 30 souris au total pour la durée du projet) et sur des rats mâles immunodéficients transplantés avec les mêmes cellules au niveau cérébral (3 rats par an au maximum soit 15 rats au total pour la durée du projet). Ces modèles sont largement utilisés pour valider les molécules d'imagerie TEP en cancérologie. Ces deux modèles animaux permettent d'obtenir des informations en termes de biodistribution corps entier (souris) et de sélectivité tumorale intracérébrale (rats) avec une résolution spatiale suffisante.

Le remplacement des expérimentations animales par des méthodes alternatives n'est pas possible puisque l'utilité même d'un radiotraceur est de permettre un suivi « *in vivo* ». L'imagerie TEP étant associée à la compréhension de processus d'ordres métaboliques et fonctionnels à l'échelle organique, il est nécessaire d'évaluer le potentiel des radiotraceurs synthétisés sur organisme afin de pouvoir estimer leur biodistribution sur un corps entier.

Le potentiel diagnostique de ces nouveaux radiotraceurs sera évalué par rapport à une molécule de référence qui est le 18F-FDG (glucose radioactif) sur les mêmes animaux en effectuant un double examen, qui a pour avantage que chaque animal constitue son propre témoin et qui diminuera le nombre d'animaux (Réduction). Cette technique d'imagerie TEP est réalisée sur des animaux anesthésiés n'entraînant aucune souffrance à l'animal (Raffinement).

15903 Les syndromes myélodysplasiques (SMD) définissent un ensemble d'affections hématologique. Ce sont des maladies chroniques et stables qui correspondent à une atteinte de la cellule souche myéloïde. Les SMD sont caractérisés par la présence d'un excès de précurseurs médullaires (cellules immatures qui après différenciation donnent les cellules matures du sang globules rouges, globules blancs et plaquettes) présentant des anomalies fonctionnelles et morphologiques. L'incidence de la pathologie est fortement liée à l'âge passant de 3 cas pour 100 000 habitants avant 60 ans à plus de 50 cas pour 100 000 habitants après 80 ans. La moyenne d'âge d'apparition de la pathologie est ainsi de 72 ans. Les SMD évoluent souvent en Leucémies Aigues Myéloïdes (LAM) à court ou moyen terme, ces LAM étant en comparaison des SMD de très mauvais pronostic. La chimiothérapie de référence dans les SMD de haut risque et les LAM est actuellement le Vidaza. 50 à 60% des patients répondent à l'Aza et voient leur espérance et leur qualité de vie significativement augmentées. Toutefois, une grande partie des patients rechute après seulement 12 mois de traitement et leur pathologie évolue alors rapidement en LAM de très mauvais pronostic. L'analyse d'une cohorte externe de patients atteints de LAM montre qu'un faible niveau d'une

protéine lysosomale est corrélé à un très mauvais pronostic puisque la médiane de survie des patients passe alors de 26 à 10 mois. Il a également été décrit dans la littérature que le niveau d'expression de cette protéine baisse avec l'âge avec une diminution encore plus marquée à partir de 70 ans. Cette observation a notamment été décrite pour l'ensemble des cellules sanguines.

Le projet que nous développons a pour but de démontrer l'importance de cette protéine clé présente au niveau du lysosome dans l'homéostasie des cellules sanguines. Dans ce but et comme il n'existe pas d'alternative ni de modèle *in vitro* de remplacement, nous développerons deux nouveaux modèles de souris dans lesquels cette protéine sera supprimée soit au niveau de toutes les cellules sanguines, soit au niveau des cellules de la lignée myéloïde.

Remplacement Nous avons déjà au laboratoire des cellules leucémiques surexprimants ou invalidées pour la protéine X ainsi que des cellules de patients atteints de SMD ou LAM avec différents niveaux d'expression de la protéine X. Toutefois ces modèles *in vitro* ne permettent pas de répondre à la question « l'extinction de la protéine X dans les cellules sanguines issues de la moelle est-elle suffisante pour induire des leucémies au cours de la vie d'un mammifère ». Le remplacement n'est donc pas possible dans ce contexte. De plus, l'utilisation de modèle murin est essentielle et unique non seulement pour l'étude des pathologies d'apparition tardive sur lesquelles nous travaillons, mais également pour une compréhension intégrative des mécanismes sous-jacents.

Réduction Le schéma de croisement a été réalisé dans le but d'utiliser la totalité des animaux générés à l'animalerie aussi bien mâle que femelle, cette démarche s'inscrit parfaitement dans une réduction du nombre de souris sacrifiées.

Raffinement La mise en place et le suivi des animaux grâce à la grille de suivi (Tableau I) s'inscrit dans une démarche de raffinement afin de mieux connaître nos 2 modèles et d'éviter au maximum l'apparition et l'installation de souffrance animale. Enfin, le modèle que nous avons choisi est conditionnel par croisement donc l'apparition de la pathologie est totalement maîtrisée et concernera uniquement les animaux issus des croisements et aucunement les animaux fondateurs, ce modèle conditionnel correspondant également à un raffinement de notre part.

Le suivi de ces 2 modèles de souris de la naissance à 24 mois devrait nous donner des indications capitales sur le rôle de cette protéine dans la croissance et la différenciation des différents types de cellules sanguines présentes dans la moelle et dans le sang. Ces données devraient nous permettre de comprendre si la baisse de cette protéine observée chez les patients est impliquée dans la pathogénèse des leucémies. Les signes cliniques de l'apparition de cette pathologie chez le patient sont principalement des baisses de globules rouges, des globules blancs et des plaquettes qui se manifestent principalement par de la fatigue. Aucune douleur particulière n'est observée dans le cadre de cette pathologie chez le patient, toutefois nous serons très attentifs et avons généré une grille de score afin de prévoir, observer et ainsi pouvoir palier à toute souffrance dès son apparition dans nos deux modèles de souris.

Nous utiliserons au cours des 5 ans de validité de ce projet 876 souris, celles-ci seront étudiées de manière systématique à 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18 et 24 mois. Notre étude est systématique, nous n'attendons aucunement l'apparition de signes cliniques pour commencer nos expériences, toutefois la connaissance au fur et à mesure de ces nouveaux modèles, nous permettra un raffinement supplémentaire et ainsi de définir si les souris souffrent d'une pathologie et à quel âge. Les expériences ultérieures prendront en compte ces paramètres, toutefois l'observation d'une souffrance au cours de notre protocole conduira à l'euthanasie des animaux. Enfin, une attention particulière sera apportée à la vivacité des souris LAMP2-KO dès leur naissance jusqu'à leurs sacrifices (ces paramètres sont clairement définis dans une grille de suivi présentée en annexe).

15904 La sélection intense sur les performances de production conduit à des animaux plus efficaces (forte croissance avec des indices de consommation moindre) mais aussi plus exigeants et moins robustes avec des conséquences négatives sur leur santé et leur bien-être. La phase de démarrage, cruciale pour le devenir des animaux, est devenue particulièrement délicate à gérer, et dépend de la qualité initiale du poussin. La qualité du poussin est définie comme un poussin en bonne santé,

capable d'exprimer son potentiel de croissance et l'approvisionnement en produits de qualité. L'amélioration de la robustesse des animaux au jeune âge passe par l'identification de nouveaux indicateurs et biomarqueurs de la qualité du poussin. Dans une première partie du projet, des indicateurs et biomarqueurs ont été identifiés pour qualifier objectivement la qualité du poussin. La suite du projet a pour principal objectif de valider la pertinence des indicateurs et biomarqueurs sélectionnés pour prédire la qualité des poussins et d'évaluer l'impact d'une bonne maîtrise des conditions pré-éclosion et post-éclosion sur ce paramètre. Pour cette phase de validation/démonstration, nous étudierons l'impact de conditions pré- et post-éclosion optimales ou dégradées chez des poulets standard issus de souche commerciale afin d'exacerber les réponses en termes de qualité de poussin et donc d'indicateurs et de biomarqueurs associés. Le lot 1 (conditions pré- et post-éclosion optimales) sera issu de poules reproductrices en cœur de ponte et les oeufs seront stockés pendant 3 à 5 jours avant d'être incubés. Après éclosion les animaux seront mis en élevage immédiatement avec un complément alimentaire favorisant le métabolisme énergétique. Le lot 2 (conditions pré- et post-éclosion non optimales) sera issu de poules reproductrices en fin de ponte, les oeufs seront stockés 15 jours avant d'être incubés puis les poussins auront une mise en place retardée de 24H (transport, fluctuations de températures et alimentation retardée). Le troisième lot sera intermédiaire avec des conditions pré-éclosion défavorables mais post-éclosion meilleures que pour le lot 2.

REMPLACEMENT Compte-tenu de l'objectif du projet, le modèle animal ne peut être substitué par un modèle d'étude *in vitro* ou *in silico* et dans le cadre de nos études nous avons besoin de prendre en considération l'animal entier.

REDUCTION Trois lots de 250 œufs embryonnés seront utilisés, soit 750 œufs. Des prélèvements seront réalisés au cours du développement embryonnaire (I0, I10 et I17) pour valider les indicateurs et biomarqueurs les plus précoces. Cent quatre-vingt-dix oeufs par lot seront mis en éclosoir. Les taux de fertilité étant de l'ordre de 80%, cela laisse espérer 140 individus éclos. 30 poussins de chaque lot seront caractérisés à J0 (jour de l'éclosion, n=90 poussins en procédure 2, prise de sang). Cent animaux par lot (50 mâles et 50 femelles) seront mis en place (n=100 animaux témoins et n=200 animaux en procédure 1, challenge de démarrage). Au total 230 animaux seront soumis aux deux procédures expérimentales. Ce nombre est nécessaire et suffisant pour pouvoir tirer des conclusions significatives en tenant compte de nos expériences précédentes et de la variabilité interindividuelle attendue pour ces observations et analyses biologiques. Les 10 animaux surnuméraires sont prévus au cas où il y ait un déséquilibre dans le sexe ratio. Dans le cas d'un très bon taux d'éclosion, les poussins éclos, non retenus dans l'expérimentation, pourraient retourner en élevage et être commercialisés.

RAFFINEMENT Les poussins seront hébergés dans des parquets à une densité très inférieure au maximum autorisé. Les animaux seront élevés en groupe au sol sur un lit de copeaux avec une alimentation et un abreuvement ad libitum. Un enrichissement de type Perch'up leur sera proposé et les animaux auront la possibilité d'explorer leur environnement. Les animaux seront observés tous les jours, 2 fois par jour. L'observation de signes cliniques tels que polypnée, prostration, yeux clos, plumage ébouriffé, diarrhée conduira à l'euthanasie de l'animal si les symptômes persistent.

15905 Les troubles du mouvement sont des pathologies neuromusculaires, souvent chroniques, qui handicapent durablement les patients et ont donc un impact sociétal important. La dystonie, par exemple, est un trouble qui se caractérise par des contractions musculaires involontaires entraînant des mouvements répétitifs. La spasticité musculaire, quant à elle, est considérée comme une sur-contraction inhabituelle et involontaire du ou des muscles. Ce trouble du système nerveux central résulte en une crispation et une rigidité accrue du muscle touché. Le traitement de ces pathologies neuromusculaires implique généralement la prescription de traitements administrés oralement le baclofène, les benzodiazépines, le dantrolène... Ces traitements systémiques comportent cependant tous des effets secondaires conséquents (sommolence, nausée, fatigue). Une solution pour diminuer ces effets secondaires consiste à administrer le baclofène via une pompe intrathécale cette approche est toutefois invasive. Alternativement, l'injection intramusculaire de certains produits directement dans le muscle affecté peut soulager ces pathologies le phénol ou la toxine

botulique. Cette approche présente de clairs avantages devant celles présentées précédemment, notamment concernant les effets secondaires. Toutefois, cette approche peut encore être optimisée les patients et soignants attendent des myorelaxants offrant encore moins d'effets secondaires, capables d'être efficaces rapidement après l'injection, et dont les effets seraient durables. L'objectif de notre projet global est de mettre en évidence l'effet bénéfique de l'utilisation locale d'un produit myorelaxant à effet rapide et durable, sur la contraction musculaire pour les patients souffrant de troubles du mouvement comme la dystonie et la spasticité. Nous démontrerons les bénéfices de nos produits face aux produits de référence utilisés en clinique.

Il n'existe à ce jour pas de test *in vitro* qui permette de tester la pharmacologie locale de ces molécules (cinétique de l'effet myorelaxant) qui est l'élément clé de leur valeur clinique, ce qui justifie donc notre étude sur modèle animal. Nous avons au cours d'une étude pilote précédente (comportant des petits groupes d'animaux) obtenu des résultats prometteurs, et ainsi identifié plusieurs produits candidats avec une activité myorelaxante rapide et durable chez le rat. Nous avons utilisé durant cette étude pilote le test du « Digit Abduction Score » (DAS), un test reconnu comme pertinent pour mesurer l'activité myorelaxante d'un produit.

Cette étude a pour objectifs i) d'optimiser la technique du DAS chez le rat ii) de développer la méthode sur un second modèle animal (la souris) iii) et de mettre au point une nouvelle méthode chez le rat et la souris permettant de mesurer l'activité myorelaxante d'une molécule (mesure du « Compound Muscle Action Potential » CMAP), le CMAP étant un paramètre clinique pertinent, utilisé par les praticiens pour mesurer l'activité musculaire. Enfin, ce projet garantira la formation à ces méthodes pour les prochains membres de l'équipe qui pourraient être recrutés à l'avenir.

Concernant l'application des 3R, le remplacement ne peut pas être assuré dans cette étape du programme de travail, car la pertinence des modèles cellulaires de coculture est aujourd'hui encore débattue, et de tels modèles ne prennent de toute façon pas en compte le paramètre de diffusion (qui est essentiel lorsqu'on s'intéresse au profil pharmacodynamique des composés). Les tests DAS et CMAP nous permettent au contraire de mesurer l'activité myorelaxante tout en prenant en compte ce paramètre.

Pour la réduction, les études précédemment réalisées nous ont donné un certain recul sur la taille des groupes nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. De plus, pour l'apprentissage des gestes techniques, les animaux seront mutualisés en cas de formation de plusieurs expérimentateurs en même temps, permettant ainsi de réduire encore le nombre total d'animaux.

Concernant le raffinement, les animaux seront hébergés en groupe (2 pour les rats et 5 pour les souris) avec enrichissement du milieu et surveillés quotidiennement. Nos études précédentes nous ont permis un raffinement du modèle DAS chez le rat l'injection intramusculaire dans le membre inférieur est réalisée sous contention par un expérimentateur entraîné, et les mesures de DAS sont brèves, indolores et peu stressantes pour les animaux. Chez la souris, compte-tenu de sa petite taille et afin de ne pas réaliser une contention stressante pour l'animal, l'anesthésie générale sera utilisée pour la réalisation de l'injection intramusculaire. Et au cours de cette étude, nous souhaitons continuer à limiter au maximum le stress des animaux c'est pourquoi un essai de renforcement positif est inclus pour la mise en œuvre du DAS. Les mesures de potentiel d'action (CMAP) via des électrodes nécessitent une anesthésie de l'animal pour limiter la douleur induite par les piqûres des électrodes.

En conclusion, cette étude nous permettra de développer des méthodes pour quantifier de manière robuste la valeur ajoutée de nos produits, à travers deux tests reconnus par la littérature. Pour cette étude, un maximum de 660 souris (souche souris CD-1, femelles) et 372 rats (souche Sprague-Dawley, femelles) sera nécessaire pour maintenir ce savoir-faire au sein de notre laboratoire durant les 5 prochaines années, en cas de recrutement ou changement de personnel.

15906 La sclérodermie (SSc) est une maladie systémique caractérisée par une fibrose cutanée et des anomalies de la microcirculation sanguine notamment un phénomène de Raynaud, très souvent inaugural. Il s'agit d'une maladie rare, qui appartient au groupe des maladies orphelines. Son

incidence varie entre 2 et 16 cas par million de sujets par an, et sa prévalence de 3 à 30 pour 100 000 habitants. Elle est 4 fois plus fréquente chez la femme que chez l'homme, et débute le plus souvent entre 30 et 50 ans. L'expression clinique et la gravité de cette maladie sont très variables. L'étendue de la fibrose cutanée peut se limiter à une atteinte des extrémités dans les formes cutanées limitées ou remonter au-dessus des coudes et des genoux dans les formes diffuses. Elle peut se compliquer d'une fibrose pulmonaire, d'une hypertension artérielle pulmonaire, d'une crise rénale, d'une atteinte de la partie inférieure du tube digestif et/ou d'une atteinte cardiaque. Ces manifestations viscérales sont associées à une diminution de la survie. Il n'existe actuellement pas de traitement curatif pour cette maladie. Les atteintes rénales sont maintenant limitées grâce à l'utilisation d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine. Les causes de décès sont aujourd'hui essentiellement cardio-pulmonaires, et l'espérance de vie globale est d'environ 70% à 5 ans. La SSc demeure une affection d'étiologie inconnue, et les facteurs à l'origine du dysfonctionnement des fibroblastes, des cellules endothéliales et des cellules du système immunitaire restent à préciser.

L'objet du présent projet est de tester *in vivo* des agents immuno-modulateurs (molécules anticorps dirigé contre des points stratégiques de régulation immunitaire et probiotiques immuno-stimulateurs) sur le développement de la Ssc. Pour cela, nous utiliserons un modèle murin de Ssc. Nous réaliserons donc 3 procédures 1- Evaluation de la posologie pour les molécules immunomodulatrices en statut sanitaire conventionnel, 2- Induction d'une sclérodémie systémique par injection intradermique d'HOCl, 3-Traitements des souris témoins et présentant une Ssc.

Ce projet s'inscrit dans un respect strict de la règle des 3R. En effet, des expériences préliminaires seront réalisées *in vitro* sur des fibroblastes en culture. Des modulateurs de l'inflammation seront testés sur ces cellules, afin de sélectionner les molécules ayant le plus d'intérêt pour minimiser le nombre de souris utilisées par la suite. Toutes ces expériences seront réalisées en animalerie avec statut sanitaire conventionnel et les deux premières procédures sur des souris présentant soit une flore intestinale normale. La procédure 1 est l'induction de la Ssc qui est provoquée par injection sous-cutanée quotidienne, pendant 5 semaines, d'une dose à faible concentration d'acide hypochloreux. Le modèle Ssc par injection d'oxydant en sous-cutané a été mis au point chez la souris il y a plus de 10 ans par notre équipe. Ce modèle murin est très proche de la pathologie humaine, très reproductible et très bien caractérisé. Afin de définir et d'optimiser les paramètres d'injection et de réduire, in fine, le nombre d'animaux nous réaliserons un test de dose préliminaire en procédure 2 (n=140). Cette seconde procédure conduira à optimiser les modalités thérapeutiques *in vivo*. Nous déterminerons ensuite si des molécules immunomodulatrices ont un effet protecteur dans le modèle murin de Ssc. Les tests de la procédure 3 seront ainsi réalisés avec les posologies de molécules immunomodulatrices déterminées dans la procédure 2. Dans la procédure 3 nous utiliserons, en plus des souris à flore conventionnelle, des souris dépourvues de flore intestinale (n=480 au total pour la procédure 3). Ainsi l'étude *in vivo* de molécules, testées au préalable *in vitro*, nous permettra d'obtenir de nouvelles pistes physiopathologiques et d'ouvrir de nouvelles perspectives de thérapeutiques immunologiques, nécessaires dans cette maladie dont la progression n'est que peu freinée par les traitements actuels.

Ce projet nécessitera 620 souris pour 3 procédures expérimentales qui s'étendront sur 5 ans, ce nombre pouvant être revu à la baisse en fonction des résultats obtenus avec les traitements par les molécules immunomodulatrices (seules les molécules les plus prometteuses seront utilisées dans les approches de thérapies cellulaires).

Des points limites ont été établis, comprenant en particulier une perte de poids de plus de 20% et tout signe de dégradation de l'état de santé- conduisant à une mise à mort de manière anticipée. Un contrôle quotidien du bien-être et de l'état général des souris sera réalisé, couplé à des mesures de score clinique réalisées 2 fois par semaine. De l'enrichissement sera placé dans chaque cage afin de ne pas perturber le comportement de nos souris.

A terme, le but de ce projet est d'étudier l'effet du statut sanitaire et du microbiote intestinal des animaux sur le développement de la sclérodémie systémique et de pouvoir proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour la traiter.

15907 Le guide de référence pour l'hébergement des animaux de laboratoire mentionne explicitement que des animaux proies et prédateurs ne doivent pas être élevés dans une même pièce pour ne pas générer de stress permanent à l'espèce proie. Un débat subsiste dans la communauté scientifique sur la possibilité d'héberger dans une même pièce rats et souris. Le rat n'est pas un prédateur naturel de la souris mais peut exercer une agressivité territoriale pouvant aller jusqu'à la mise à mort de la souris. Ainsi, le stress de mise en présence olfactive est actuellement un pré-supposé qui doit être formellement démontré. L'étude cherchera à exposer des souris à des fécès de rats et d'autres souris pour mesurer l'impact comportemental que cela génère (temps de latence à venir chercher une friandise) selon si les souris ont toujours été élevées en présence de rats ou non.

Nous chercherons enfin à déterminer si l'impact potentiellement mis en évidence dans l'une ou l'autre des situations est réversible par un traitement anxiolytique. Aucun geste invasif ne sera pratiqué sur les animaux en dehors de l'injection des traitements anxiolytiques.

Dans la mesure du possible, les animaux utilisés seront des animaux de réforme non utilisés précédemment.

Le nombre d'animaux sera de 160 animaux pour la durée totale du projet.

Ce projet respecte la règle des 3R :

Réduire le nombre d'animaux minimum pour obtenir des résultats scientifiques valables sera déterminé au cours de l'étude pilote. Par ailleurs, nous privilégierons des animaux de réforme destinés à l'euthanasie.

Remplacer les méthodes d'évaluation du stress invasives comme les prélèvements sanguins et dosage sont remplacées par des méthodes comportementales non invasive. L'étude portant sur l'évaluation du comportement animal, il n'est pas possible de passer exclusivement sur des méthodes *in vitro*.

Raffiner le niveau de sévérité de l'étude est léger. L'utilisation d'une friandise permet un renforcement positif et le stimulus anxiogène (fécès de rat) est présenté de façon très transitoire. Les animaux sont hébergés en répondant au besoin de l'espèce, dans un environnement enrichi et font l'objet d'une observation quotidienne.

15908 Les produits de santé (médicaments, dispositifs médicaux, etc.) constituent un élément clé dans la dispensation de soins de qualité aux patients. En effet, 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, par nature, ils sont destinés à être mis en contact avec le corps humain et peuvent donc entraîner des effets secondaires au niveau du site d'implantation des dégradations importantes des tissus environnants peuvent nécessiter une ré-intervention chirurgicale. Des séquelles fonctionnelles peuvent en résulter dans les cas les plus graves. L'innocuité des produits de santé doit donc être testée pour garantir le bon rétablissement des patients après chirurgie. Par ailleurs, tout produit de santé se doit d'être efficace lors de son utilisation clinique.

Il est donc impératif, comme le souligne la réglementation (ex ISO 10993, Pharmacopées Nationales, lignes directrices (OCDE), directive 2007/47/CE), de prouver l'efficacité des produits de santé et de réduire au minimum le risque que des réactions indésirables se manifestent 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 ni de couvrir l'ensemble des risques toxiques incombant aux produits de santé ni d'en tester intégralement l'efficacité, 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.

Dans ce projet, il s'agit principalement d'évaluer la performance de produits de santé utilisés en chirurgie des tissus mous (ex mèches de renforcement ou de réparation des tissus mous, produits

hémostatiques ...). Les porcins, les petits ruminants, les rongeurs (rats) et lagomorphes sont alors des modèles privilégiés étant donné 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). Le nombre d'animaux utilisés dans le cadre de ce projet est estimé à 370 par an.

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). Les rongeurs et porcins sont hébergés en groupes sociaux harmonieux sauf lorsque les contraintes de l'étude l'empêchent. Dans tous les cas, pour toutes les espèces sociales, l'hébergement individuel devra être justifié et validé par la structure du bien-être animal. Concernant les lagomorphes, des contacts visuels, olfactifs, auditifs voire tactiles entre congénères sont maintenus grâce à la structure des compartiments. Des enrichissements standards spécifiques à chaque espèce (produits de nidification pour les rongeurs, jouets pour les porcins et chaînette + bâton à ronger pour les lagomorphes) sont présents dans les hébergements. Enfin, de la musique est diffusée en salle d'hébergement.

Un comité d'éthique et une structure du bien-être animal intégrant plusieurs vétérinaires travaillent à temps plein de façon à veiller à l'application du meilleur niveau de soin.

15909 Le rétrécissement aortique (RA) chez l'adulte est la valvulopathie la plus répandue dans les pays développés. Sa fréquence a augmenté dans les dernières décennies due au vieillissement général de la population. Cette pathologie est caractérisée par une diminution du diamètre de la valve aortique suite à une calcification provoquant ainsi une gêne à l'expulsion du sang. Le seul traitement qui permet actuellement d'éviter une évolution fatale consiste à remplacer la valve aortique par voie chirurgicale ou percutanée. Comprendre les mécanismes d'évolution de la maladie est donc un enjeu majeur pour envisager à terme un traitement médical qui ralentirait l'évolution du RA et éviterait le recours au remplacement valvulaire.

Il est connu que les patients ayant eu une radiothérapie du thorax sont plus à risque de développer un RA. Basé sur cette observation, notre laboratoire a récemment mis en place un modèle in-vivo fiable de RA suite à l'irradiation de la valve chez la souris. L'irradiation des valves chez ces animaux provoque une altération de leur structure et de leur fonctionnement. Il apparaît, sur les souris irradiées, un épaississement de la valve ainsi que le développement de dépôts calciques. Le développement d'une fibrose est également détectable. Ce modèle in-vivo étant validé, nous nous proposons de l'utiliser pour évaluer le rôle d'une protéine canal appelée TRPM4 dans les processus de calcification valvulaire.

La protéine Transient Receptor Potential Melastatin 4 (TRPM4) est un canal cationique non sélectif perméable aux cations monovalents (Na^+ et K^+), activé par le calcium intracellulaire. Les travaux de notre laboratoire ont montré que ce canal participait à la régulation du rythme cardiaque et aux potentiels d'action au niveau des cardiomyocytes atriaux et du tissu conducteur. Il favorise également les arythmies induites par les épisodes d'hypoxie. Une partie de ces résultats ont été obtenus grâce à l'utilisation d'un modèle de souris transgéniques invalidées pour le gène *Trpm4* (*Trpm4*^{-/-}). Dans une étude récente, nous avons observé que le canal TRPM4 jouait également un rôle dans le développement des fibroblastes cardiaques, parallèlement à son rôle dans l'activité électrique des cardiomyocytes. En effet, l'inhibition pharmacologique du canal TRPM4 réduit le développement des fibroblastes atriaux humains et murins en culture, ainsi que leur transition vers un phénotype myofibroblastique. Cette transition est une des étapes conduisant à la calcification des valves. En effet, les cellules interstitielles valvulaires (VIC), initialement quiescentes, effectuent

une transition vers ce phénotype myofibroblastique puis ostéoblastique sous différents stimuli connus pour provoquer la calcification. Nous avons ainsi émis l'hypothèse que le canal TRPM4 pourrait participer à cette transition des VIC vers le phénotype ostéoblastique et ainsi favoriser le rétrécissement aortique. Nos données préliminaires obtenues sur des VIC humaine en culture confirment que le canal TRPM4 est exprimé par ces cellules. L'utilisation du modèle in-vivo de rétrécissement aortique induit par irradiation de la valve nous permettra de déterminer l'implication du canal dans ce phénomène.

Dans cette étude nous utiliserons 4 groupes de souris : contrôle *Trpm4*^{+/+}, irradiées *Trpm4*^{+/+}, contrôle *Trpm4*^{-/-}, irradiées *Trpm4*^{-/-}. Nous utiliserons 20 souris par groupe qui est le nombre minimal pour obtenir des résultats statistiquement comparables fiables, d'après les résultats préalablement obtenus sur le modèle d'irradiation des valves. Un groupe de 20 souris supplémentaires est ajouté afin de mettre en place et de valider les différents protocoles et de palier à une éventuelle perte d'animaux. Dans l'objectif de réduire à son maximum le nombre d'animaux utilisé ce dernier groupe ne sera utilisé uniquement en cas de nécessité.

Notre étude sur l'implication du canal TRPM4 dans le rétrécissement aortique comporte une partie effectuée sur des cultures cellulaires de VIC. Toutefois cette approche ne permet d'appréhender réellement le remodelage induit par l'irradiation. D'une part parce que l'irradiation de cellules en culture est relativement éloignée de celle de cellules in-situ et, d'autre part, parce que la complexité du remodelage valvulaire est difficile à appréhender sur le modèle de culture. Ce travail nécessite donc l'utilisation de souris.

Concernant le raffinement des conditions expérimentales, il est important de signaler ici que les manipulations sont réalisées dans une structure iso 9001. Les animaux seront hébergés dans des cages standards aux normes européennes (type IV). La nourriture, la boisson et la litière seront changées une fois par semaine. La litière de peuplier "aspen small", plus douce et variée pour les animaux permettra de réduire le niveau de stress et possède les avantages d'être peu poussiéreuse et moins allergisante que le résineux. Les animaux seront hébergés par groupe de 5 afin de conserver les interactions sociales. La litière sera enrichie avec de la litière cellulose Alpha Dry permettant la confection de nid, ainsi qu'une cabane en carton permettant de se cacher durant la période d'exposition à la lumière. A la suite des procédures, un suivi régulier sera effectué pendant 7 jours par du personnel formé et expérimenté. Une attention particulière sera accordée dans les premiers jours post-irradiation notamment sur la zone traversée par le rayonnement X afin de détecter d'éventuelles lésions cutanées. Si l'apparition de la perte de poids (plus de 10% de perte par rapport au poids avant irradiation), l'aspect des poils et le comportement de l'animal par rapport à ses autres congénères seront surveillés étroitement (matin et soir). Nous suivrons les indications de recommandations de la "Mouse Grimace Scale" dès les premières heures post-irradiation pour effectuer une analyse de l'état de la santé de l'animal. Si un animal a un score strictement supérieur à 4 en suivant cette échelle, la procédure de mise à mort sera effectuée selon les recommandations de la directive Européenne 2010/63 / EU.

15910 Les cellules B (ou lymphocytes B) nous protègent lors d'une infection par des microbes (bactéries, virus, etc.) grâce à leur capacité à fabriquer des anticorps. Le projet de recherche est axé sur une population spécifique de lymphocytes B humains. Cette population a été proposée comme un acteur majeur dans les réponses immunitaires contre le pneumocoque (une bactérie responsable de pneumonies, méningites et septicémies) et de manière plus générale contre les bactéries infectieuses encapsulées, c'est à dire entourées par une couche épaisse (la capsule) de sucres.

Nous posons l'hypothèse que cette population de lymphocytes B pourrait se développer dans des structures lymphoïdes situées dans l'intestin appelées « GALTs ». De plus, les bactéries présentes dans l'intestin pourraient lui donner des signaux d'activation et lui permettre de modifier (ou de muter) les anticorps qu'elle produit. Ceci lui permettrait de réagir très rapidement lors d'une infection par le pneumocoque ou d'autres bactéries encapsulées, en produisant un grand nombre d'anticorps mutés.

Il n'existe pas à l'heure actuelle de modèle substitutif permettant de reproduire *in vitro* les interactions cellulaires complexes nécessaires au développement puis à la fonction du système

immunitaire humain. Ainsi, pour pouvoir tester notre hypothèse, l'utilisation d'un modèle de souris humanisées pour leur système immunitaire (HSI) est indispensable. Notre but est -

1/obtenir un modèle de souris « HSI-GALTs » simple à mettre en œuvre et présentant un système immunitaire humain ainsi que des GALTs, contrairement aux autres modèles HSI existants

2/ étudier le développement de la population des cellules B d'intérêt en présence ou non de bactéries dans l'intestin,

3 / étudier la fonction de cette population en évaluant sa réponse à une vaccin anti-pneumocoque dans le modèle HSI-GALTs.

Le modèle repose sur l'utilisation d'une lignée de souris dont le système immunitaire est déficient et que nous grefferons avec des cellules souches sanguines humaines afin qu'elles développent un système immunitaire essentiellement humain. Les greffes seront réalisées sur des animaux nouveau-nés, et les animaux greffés seront sacrifiés à l'âge adulte (à 12, 20 ou 21 semaines) pour analyse du développement des cellules B et des GALTs. L'obtention d'un modèle HSI-GALTs (en utilisant 40 animaux) conditionnera la poursuite du projet dans son intégralité. Auquel cas, un nombre total de 120 animaux au maximum sera utilisé sur une durée de 5 ans.

En conformité avec la règle des 3R, ce nombre d'animaux est nécessaire et suffisant pour répondre aux questions posées. En effet, les effectifs par groupe d'animaux nous permettront, selon les paramètres étudiés et lorsqu'une analyse statistique est requise, d'appliquer les tests statistiques adéquats. L'immunodéficiência des animaux avant greffe est généralement sans incidence dans les conditions d'élevage qui garantissent un maintien d'un statut sanitaire exempt d'organismes pathogènes spécifiques ou opportunistes. De plus, les procédures envisagées (myelo-ablation sans irradiation, greffe de cellules souches hématopoïétiques par injection, traitement antibiotique et vaccination) seront faites avec des volumes minimums le cas échéant et ne sont pas supposés générer de mortalité, de douleurs importantes ou de dommages chez les animaux. Nous veillerons cependant à surveiller attentivement les points limites des animaux en cours de procédures et à les euthanasier de façon anticipée en cas d'atteinte des points limites. Enfin, les souris seront hébergées dans un environnement enrichi (boules de coton, maisonnettes en carton et bâtonnets en bois à ronger).

Le bénéfice attendu du projet sera une meilleure compréhension du développement de cette population de cellules B et de son rôle dans les réponses immunitaires contre les bactéries encapsulées chez l'homme.

Ceci pourrait permettre de mieux comprendre pourquoi ces réponses sont peu ou pas fonctionnelles avant l'âge de 2 ans et d'élaborer de nouveaux vaccins anti-pneumocoques en ciblant notamment ces cellules dans les GALTs. Au-delà de notre projet de recherche, compte tenu du fait que les GALTs constituent une composante majeure du système immunitaire de façon plus générale, notre modèle pourra constituer un modèle expérimental plus prédictif des réponses humaines, et pourra être utilisé au cours d'études vaccinales et/ou infectieuses pré-cliniques.

15911 L'infarctus du myocarde représente la principale cause de mortalité à ce jour. Il est la conséquence de l'obstruction des artères coronaires. Celle-ci conduit à une ischémie tissulaire (manque d'oxygène) qui induit la mort des cellules contractiles du cœur puis une insuffisance cardiaque. Après l'ischémie, les cellules immunitaires sont recrutées en réponse aux chimiokines dans le cœur ischémique. La chimiokine CXCL12 et ses récepteurs CXCR4 et CXCR7 sont essentiels au développement du système cardiovasculaire et ont un rôle important dans les processus physiopathologiques tels que l'inflammation, l'angiogenèse, mais également dans le remodelage tissulaire suite à une ischémie.

La chimiokine citée exerce son rôle via sa liaison à ses récepteurs et aux héparanes-sulfates de la matrice extracellulaire. Des études sur des modèles expérimentaux d'infarctus ont montré que l'axe chimiokine/récepteurs est rapidement activé, cependant son rôle reste méconnu. Notre projet a pour but d'étudier, chez la souris, son rôle dans le remodelage et la régénération cardiaque post-infarctus.

La réponse tissulaire à l'ischémie est un phénomène complexe que des modèles *in vitro* ne peuvent pas recréer. Seule ces modèles *in vivo*, nous permettrons de comprendre le rôle de CXCL12 et de ses récepteurs dans le remodelage et la réparation consécutifs à une ischémie myocardique.

L'étude envisagée est très complète et étudie le rôle de cette chimiokine et de ses deux récepteurs par plusieurs procédés à la fois sur des souris adultes et des souriceaux issus de 7 lignées + les littermates de chaque lignée qui serviront de souris contrôles. C'est pourquoi ce projet devrait utiliser 13 760 souris génétiquement modifiées ce qui nous permettra d'analyser le rôle de ces interactions.

Ces animaux subiront un infarctus du myocarde puis sacrifiés à différents temps. L'analyse consistera à étudier la fonction cardiaque par échographie, le remodelage du tissu cardiaque par des analyses histologiques permettant d'analyser la structure du tissu et enfin la réponse inflammatoire, qui permettra de savoir quels types de cellules inflammatoires sont recrutés au niveau du cœur après l'ischémie.

Afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligée aux animaux, les procédures se dérouleront sous anesthésie et antalgiques avec une surveillance journalière. Enfin, des points-limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

A terme, les résultats de ce projet permettront de mieux comprendre le rôle de la chimiokine CXCL12 et de ses récepteurs dans le contrôle de l'inflammation associée à l'infarctus du myocarde et la régénération cardiaque. Ces résultats permettront le développement de nouvelles thérapies.

15912 La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est la première cause de cécité chez les personnes âgées dans les pays industrialisés. Elle concerne environ 8% de la population française. Avec le vieillissement de la population, l'incidence de la DMLA ne cesse de croître, on estime qu'elle touchera 288 millions de personnes du monde entier en 2040.

La maladie débute par une phase précoce caractérisée par l'accumulation de petits dépôts riches en lipides (drusen) sous l'épithélium pigmentaire de la rétine (EPR). Dans environ la moitié des cas et sous l'influence de multiples facteurs (âge, tabac, hypertension artérielle, obésité, prédisposition génétique), la maladie évolue en formes dégénératives avancées, atrophique ou humide. La forme atrophique est caractérisée par la disparition progressive des cellules de l'EPR puis les photorécepteurs situés au niveau de la macula. Il n'y a pas de traitement spécifique de la forme sèche. La forme humide, dite néovasculaire, se traduit par la prolifération des néovaisseaux anormaux provenant de la choroïde (CNV) qui vont traverser la membrane de Bruch et s'étendre dans l'espace sous-rétinien. Ces vaisseaux fragiles sont responsables de l'oedème maculaire et/ou hémorragie. Les injections intravitréennes (IVT) intensives des anti-VEGFs sont le seul traitement de la CNV pour diminuer l'oedème et améliorer la vision. Mais les anti-VEGF ne bloquent pas la progression des néovaisseaux. Ainsi environ 40% des patients résistent au traitement au bout de 2 ans malgré les injections répétées des anti-VEGF. Les anti-VEGF n'ont pas non plus d'effet sur la progression de la CNV vers la fibrose. Nous devons donc poursuivre des recherches visant à décourir de nouvelles cibles thérapeutiques. Certains facteurs du complément (facteurs C5, C3, H du complément) et des facteurs de l'inflammation (TNF) sont fait l'objet d'investigation.

Nous avons montré que l'activation excessive du récepteur minéralocorticoïde (MR) induisait l'oedème rétinien, l'inflammation, le stress oxydatif et la pathologie choroïdienne. Les antagonistes du MR exercent les effets anti-inflammatoires et anti-angiogéniques qui sont VEGF-indépendants dans le modèle de CNV induite par laser. L'effet anti-angiogénique de la spironolactone est partiellement médié par la décorine exprimée abondamment dans la membrane Bruch de l'EPR et la choroïde. L'objectif de ce projet est d'approfondir notre connaissance sur le rôle du MR dans la DMLA, de tester le potentiel thérapeutique de plusieurs molécules (spironolactone, décorine, lipocaline 2 (NGAL), météorine) et d'étudier leurs mécanismes d'action.

Plusieurs modèles se réaliseront sur les rats et les souris le modèle de CNV induite par laser et le modèle de fibrose qui récapitulent le processus angiogénique et fibrotique de la CNV, l'exérèse du ganglion cervical supérieur (GCS) afin d'étudier la régulation sympathique des vaisseaux choroïdiens, le modèle de néphrectomie unilatérale+aldostérone+sel (NAS) qui présente une

surcharge minéralocorticoïde, et le modèle de dégénérescence rétinienne aiguë induite par illumination.

Un total de 2136 rats et 160 souris sont utilisés. La mise en oeuvre pratique des 3R

- Remplacement : Nos modèles animaux sont utilisés pour étudier des mécanismes physiologiques visibles uniquement à l'échelle de l'animal. Toutes les études plus spécifiques sur des mécanismes plus délimités seront effectuées avec des cultures cellulaires.

- Réduction : Les rats Spragues-Dawley transgéniques avec surexpression du MR ou inactivation de NGAL, ainsi que les souris avec surexpression du MR sont partagés entre plusieurs équipes qui travaillent sur d'autres sujets de recherche et sur d'autres organes. Les examens morphologiques et fonctionnels *in vivo* assurent un suivi du même animal et permettent une réduction du nombre d'animaux sacrifiés.

- Raffinement : Les protocoles thérapeutiques, les points limites et les critères d'interruption de l'expérimentation sont pré-définis afin d'assurer le bien-être des animaux au cours de cette étude. Les procédures utilisées dans ce projet peuvent induire une souffrance légère ou modérée. Les modèles expérimentaux se réalisent après anesthésie générale et locale. Un anti-inflammatoire non-stéroïdien et une analgésie pré et post-opératoire sont administrées lors de l'exercice du GCS et de la création du modèle NAS. Un suivi rigoureux des animaux est mis en oeuvre afin d'assurer le bien-être des animaux du début à la fin de l'étude.

15913 La myasthénie grave est une maladie auto-immune rare. Elle est liée à la production d'auto-anticorps dirigés essentiellement contre le récepteur à l'acétylcholine, situé sur la membrane post-synaptique à la jonction neuromusculaire. Ces auto-anticorps altèrent la transmission de l'influx nerveux entre le nerf et le muscle conduisant à une faiblesse et une fatigabilité musculaire variable ainsi qu'une atrophie chez certains patients. Normalement, la réparation et la régénération des muscles abimés sont assurées par des cellules souches musculaires appelées cellules satellite (CSs). L'implication et la fonctionnalité de ces cellules dans le muscle de patients atteints de myasthénie auto-immune restent encore inconnues.

Diverses études montrent que le fonctionnement des CSs serait sensible à l'activation de la protéine AhR, une protéine senseur de l'environnement.

L'objectif de ce projet est donc de 1) déterminer les différences entre des CSs issues de patients myasthéniques versus muscles contrôlés; et 2) comprendre l'implication de la protéine AhR et des facteurs de l'environnement dans les différences. La compréhension du mode d'action de ces cellules dans le contexte myasthénique et de l'impact de l'environnement, nous permettra peut-être de proposer une thérapie cellulaire/ ou préventive améliorant la fonction musculaire des patients myasthéniques ainsi que leur qualité de vie.

L'analyse des mécanismes de réparation du muscle myasthénique sera réalisée dans la souris. Nous utiliserons 1) le modèle de régénération musculaire classique pour comprendre le fonctionnement des CSs humaines myasthéniques (comparé à des CSs contrôlés) et 2) le modèle de myasthénie expérimentale (EAMG) pour caractériser le rôle de AhR.

Dans ce projet d'une durée de 5 ans, nous utiliserons 300 souris réparties en 160 souris pour le modèle EAMG et 140 souris NOD-SCID pour le modèle de régénération. Les souris seront anesthésiées pour l'expérimentation et mises sous analgésiques en pré et pour la période post-expérimentation. Toute la démarche scientifique a été établie afin de respecter la règle des 3R (remplacer, réduire et raffiner).

Cette analyse *in vivo* ne peut être remplacée par des études conduites *in vitro* du fait de l'absence de modèle cellulaire *in vitro* reproduisant simultanément la réparation musculaire, l'exposition environnementale, la réaction auto-immune sur la jonction nerf/muscle. La démarche scientifique est établie afin d'obtenir des résultats statistiques pertinents en utilisant le moins de souris possible. Le raffinement des expériences est assuré par la mise en place de points limites pour éviter l'inconfort et la douleur des souris. Ainsi, toutes les dispositions visant à prévenir le stress et la douleur seront prises en compte et en charge par un suivi quotidien des animaux.

15914 L'œdème maculaire est une cause majeure de déficience visuelle qui intervient au cours de nombreuses pathologies rétinienne parmi lesquelles sont la rétinopathie diabétique (RD) et les inflammations intraoculaires (uvéites). De forte dose de glucocorticoïdes sont utilisées en injection intra-oculaire pour traiter l'inflammation et l'œdème de la rétine avec parfois des effets secondaires sévères (glaucome, cataracte). Les glucocorticoïdes se lient au récepteur glucocorticoïde, mais aussi au récepteur minéralocorticoïde (MR) qui a une affinité équivalente pour l'aldostérone et le cortisol. Une activation excessive du MR induit l'inflammation, le stress oxydatif et la fibrose qui contribuent au développement des maladies cardiovasculaires, rénales et métaboliques. Le MR est exprimé dans la rétine, l'épithélium pigmentaire, la choroïde et l'iris-corps ciliaire de l'oeil. Nous avons montré qu'une forte dose d'aldostérone administrée dans l'oeil induisait des gènes pro-inflammatoires et entraîne une inflammation à 24 h. Dans la rétine et la choroïde, l'activation du MR peut aussi induire l'œdème et la pathologie choroïdienne. Néanmoins, dans un modèle d'uvéite induite par endotoxine, le traitement préventif de l'aldostérone a un effet anti-inflammatoire. La lipocaline-2 (NGAL) est un marqueur de l'activation du MR dans le système cardiovasculaire et rénale. La lipocaline -2 est augmentée dans liquide intraoculaire des patients atteints d'uvéite; elle est aussi augmentée dans plasma des patients atteints de rétinopathie diabétique. Son rôle dans l'inflammation oculaire n'est pas clair, parfois controversé des études.

L'objectif de ce projet est d'étudier le rôle du MR et la lipocaline-2 dans la rétine inflammée et d'identifier les mécanismes. Quatre modèles expérimentaux se réaliseront sur les rats et souris l'uvéite induite par endotoxine, l'uvéite autoimmune expérimentale, le diabète de type 1 induite par streptozotocine et un modèle de diabète de type 2 spontanée (rat Goto-kakizaki).

Un total de 1040 animaux seront utilisés (320 rats et 720 souris). La mise en oeuvre pratique des 3R

- Remplacement : Nos modèles animaux sont utilisés pour étudier des mécanismes physiopathologiques visibles uniquement à l'échelle de l'animal. Toutes les études plus spécifiques sur des mécanismes plus délimités seront effectuées avec des cultures cellulaires.

- Réduction : Les rats (NGAL KO) et les souris transgéniques (Lyscre-MR-KO, Vecadh-MR-KO, Tie2-MR-KO et SMA-MR-KO) sont partagés entre plusieurs équipes qui travaillent sur d'autres sujets de recherche et sur d'autres organes. Les examens morphologiques et fonctionnels *in vivo* assurent un suivi d'un même animal à différents stades de la maladie et permettent une réduction du nombre d'animaux sacrifiés.

- Raffinement : Les protocoles thérapeutiques, les points limites et les critères d'interruption de l'expérimentation sont pré-définis afin d'assurer le bien-être des animaux au cours de cette étude. Les procédures utilisées dans ce projet peuvent induire une souffrance légère ou modérée. Les modèles expérimentaux se réalisent après anesthésie générale et locale. Un suivi rigoureux des animaux est mis en oeuvre afin d'assurer le bien-être des animaux du début à la fin de l'étude.

15915 La rosacée est une maladie inflammatoire chronique de la peau caractérisée par des bouffées de chaleur, des papules et des manifestations oculaires. Elle touche environ 10 % de la population. Aux Etats-Unis, environ 16 millions de personnes sont touchées. Bien que l'étiologie de la rosacée soit inconnue, il y a une dysrégulation des systèmes inflammatoire et neurovasculaire.

Le sous-type de rosacée oculaire représente entre 10-50 % de la population totale de rosacée et se définit comme une atteinte au niveau de la surface oculaire et des paupières pouvant entraîner de graves problèmes de vision tels que des ulcérations récurrentes et une néovascularisation cornéenne. Il n'existe à ce jour aucun traitement pour la rosacée oculaire qui soit efficace. Les options thérapeutiques actuelles sont non spécifiques et ne sont pas efficaces. Une meilleure compréhension du mécanisme de la maladie est nécessaire afin de trouver un traitement spécifique.

La peau est non seulement une cible périphérique des stéroïdes systémiques, mais également un organe endocrinien en synthétisant elle-même les glucocorticoïdes qui jouent un rôle important dans l'homéostasie de la peau. Néanmoins, le traitement local chronique des glucocorticoïdes peut induire des lésions cutanées ressemblables à la rosacée.

Les récepteurs des glucocorticoïdes (GR) et des minéralocorticoïdes (MR) sont tous les deux exprimés dans la peau ainsi que dans la cornée et la conjonctive. Tandis que le GR ne peut être activé que par les glucocorticoïdes, le MR peut lier les glucocorticoïdes et l'aldostérone avec la même affinité. Le GR et le MR sont tous les deux importants dans l'homéostasie de la peau. Cependant, il n'y a aucune donnée qui montre une synthèse locale d'aldostérone dans la peau ou dans l'oeil. Nous avons récemment montré que l'inactivation du MR améliorait l'atrophie épidermique et l'épithélialisation cornéenne dans la guérison des plaies cornéennes induites par les glucocorticoïdes. Nos résultats préliminaires ont montré que les tissus de la surface oculaire et de la peau des patients atteints de rosacée expriment le GR et le MR. De plus, les antagonistes pharmacologiques du MR ont diminué l'angiogenèse cornéenne et l'infiltration des cellules inflammatoires dans la cornée. Nous avons également montré que dans la rétine et la choroïde, l'activation du MR peut induire de l'oedème et contribuer à l'inflammation et à l'angiogenèse. Récemment, il a été montré que la lipocaline-2 (NGAL) est une nouvelle cible du MR. NGAL semble être impliquée dans des maladies oculaires et/ou dans des processus inflammatoires mais son rôle dans la rosacée oculaire reste inconnu.

Notre hypothèse est que la suractivation de la voie minéralocorticoïde contribue à la pathogenèse des lésions de la rosacée oculaire. L'objectif de ce projet est 1) d'identifier le rôle des corticostéroïdes et des récepteurs GR/MR dans cette pathologie en utilisant des modèles de rat et des échantillons biologiques de patients; 2) développer et évaluer de nouvelles formulations oculaires de spironolactone, un des antagonistes pharmacologiques du MR, pour mieux cibler la maladie. Nous espérons élucider le lien entre la rosacée oculaire et les voies GR/MR ce qui permettra d'ouvrir de nouvelles options thérapeutiques.

Dans cette étude, l'utilisation de l'animal entier est nécessaire pour apprécier les mécanismes physiopathologiques intégrés.

Les rats SPRAGUE DAWLEY transgéniques (surexpression du MR ou inactivation de NGAL) et leurs contrôles littermates seront utilisés. Cette souche a été utilisée pour la modification génétique en raison de la facilité à manipuler son génome, contrairement à d'autres modèles de rats. Les rats lewis ne sont utilisés que pour tester les formulations oculaires en gouttes parce qu'ils sont souvent utilisés pour les études pharmacocinétiques et qu'ils sont sensibles à l'induction de l'inflammation oculaire, l'aspect essentiel dans la pathologie de la rosacée oculaire.

Le nombre de rats (1584 rats) est réduit au minimum pour ne pas interférer les résultats. Ces rats seront aussi partagés entre différentes équipes dans un même centre. Les procédures utilisées dans le projet pouvant entraîner une souffrance modérée pour les animaux, des mesures de prévention et des points limites précoces ont été mis en place pour réduire ou éviter la douleur. Toutes les procédures réalisées seront réalisées sous anesthésie générale et locale. A la fin de chaque manipulation, les animaux reçoivent également un antibiotique (tobramycine) pour éviter toute surinfection. Les animaux bénéficient également d'une analgésie systémique pendant les premiers jours du protocole. Afin d'éviter l'hypothermie pendant l'anesthésie, les animaux sont placés sous une lampe chauffante. Un suivi rigoureux des animaux est mis en oeuvre afin d'assurer le bien-être des animaux du début à la fin de l'étude. Nos modèles animaux sont utilisés pour étudier des mécanismes physiopathologiques visibles uniquement à l'échelle de l'animal. Toutes les études plus spécifiques sur des mécanismes plus délimités seront effectuées avec des cultures cellulaires.

- 15916** Le projet vise à décrire la capacité de rétablissement de la balance hydrique des lézards en fonction de la nourriture proposée en termes de contenu en eau et de position dans le réseau trophique. L'énergie et l'eau sont toutes deux nécessaires au bon fonctionnement des organismes vivants. Quand l'eau libre n'est pas disponible en continu dans le milieu, il est généralement supposé que les animaux se procurent de l'eau par d'autres moyens, notamment via l'eau présente dans leur nourriture. Cependant, quelques études récentes chez des reptiles carnivores des milieux désertiques et des serpents suggèrent que la consommation alimentaire représente un coût hydrique plutôt que de permettre un gain en eau. La situation est moins claire pour les reptiles généralistes, généralement des « insectivores », et ce projet vise donc à déterminer si la consommation d'invertébrés permet à un méso-prédateur généraliste comme le lézard vivipare

(*Zootoca vivipara*) d'extraire de l'eau ou non. Le protocole sera appliqué à 120 mâles adultes capturés dans des enclos semi-naturels et répartis dans 4 lots expérimentaux en restriction hydrique (consommation d'une espèce de grillon, n=20; d'une espèce de grillon élevée dans des conditions déshydratantes, n=20; d'araignées, n=20; ou de cloportes, n=20) et 2 lots témoin (un lot en restriction hydrique, n=20; un lot sans restriction hydrique, n=20). Avant et après l'expérience, nous quantifierons l'état de déshydratation physiologique des animaux par une prise de sang. Avant, pendant et après l'expérience, nous suivrons des indicateurs morphologiques de l'état de déshydratation individuel. Ce protocole permet de tester si l'apport d'eau alimentaire varie en fonction de la teneur en eau de l'aliment (en comparant les insectes hydratés ou déshydratés) et de la position de la proie dans la chaîne trophique (en comparant les trois types d'invertébrés). Dans le cadre de cette étude, il est impossible de remplacer le modèle biologique par un équivalent cellulaire ou *in silico*. Afin de réduire la taille des effectifs, un échantillon minimum sera utilisé en étudiant uniquement une seule classe d'âge et de sexe (adulte mâles) et afin de raffiner les conditions expérimentales l'environnement d'élevage impliquera un enrichissement des cages, des conditions climatiques estivales habituelles du milieu naturel et une période d'acclimatation de deux à trois semaines avant l'expérience.

15917 Les maladies liées au métabolisme énergétique (obésité, diabète de type II et le syndrome métabolique) sont un problème important du fait de leur prévalence dans le monde. La compréhension des mécanismes physiopathologiques qui sont à l'origine de ces maladies et l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques, peuvent contribuer à une amélioration significative et à une meilleure prise en charge des patients qui en souffrent. Parmi tous les tissus de l'organisme, le tissu adipeux représente un des sites les plus importants impliqués dans le développement de troubles métaboliques. Le tissu adipeux produit des signaux hormonaux qui sont capables de réguler des fonctions très importantes dans l'organisme, par exemple, l'appétit, la réponse immunitaire, la coagulation et le tonus vasculaires (hypertension artérielle). Dans la dernière décennie, plusieurs groupes ont démontré dans des cellules en culture que le récepteur minéralocorticoïde (RM), une protéine connue pour son rôle dans la régulation de la pression artérielle et l'homéostasie du sodium dans le rein, est activement impliqué dans la physiologie des adipocytes et des cellules myéloïdes, en particulier la différenciation et la production des signaux inflammatoires. La détermination des mécanismes moléculaires de l'activation du RM adipocytaire, ainsi que les gènes cibles induits par ce dernier permettraient d'expliquer le rôle du RM dans les désordres métaboliques et de mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles. Afin de respecter les règles des 3 R (remplacer, réduire, raffiner), nous appliquerons les procédures suivantes

Remplacer Notre sujet d'étude, le syndrome métabolique, implique l'étude des interactions entre les différents organes du métabolisme et le système immunitaire. Il n'est pas possible d'obtenir les mêmes informations sans l'utilisation d'un modèle chez la souris.

Réduire Nos modèles de souris intéressent plusieurs membres de l'équipe qui pourront travailler en parallèle sur les mêmes animaux afin d'optimiser le nombre d'animaux utilisés. Nous déterminons la taille des groupes expérimentaux par des études préliminaires et en nous basant sur la littérature, à l'aide de tests statistiques. Nous utiliserons des groupes de 10 souris, avec une répétition de chaque expérience pour limiter la dispersion biologique des paramètres étudiés. Nous utiliserons donc le moins de souris possible pour atteindre notre objectif. Un total de 800 souris sera utilisé afin d'étudier différents régimes obésogènes, différents génotypes et différents traitements, ainsi que pour étudier à la fois mâles et femelles.

Raffiner Les protocoles que nous allons utiliser sont maîtrisés et utilisés régulièrement dans notre équipe. Les points limites ainsi que les critères d'interruption d'expérimentation sont pré-définis et un suivi rigoureux des animaux est mis en oeuvre afin d'assurer le bien-être des animaux du début à la fin de l'étude.

15918 Les animaux réagissent de façon individuelle et directe aux changements dans leur environnement par des ajustements comportementaux. L'étude de ces ajustements permet de comprendre des

patrons écologiques généraux comme l'utilisation de l'habitat ou la distribution des espèces à une échelle globale. Les espèces ectothermes sont particulièrement sensibles aux variations de l'environnement car la régulation de leur température corporelle dépend de la distribution spatiale et temporelle des opportunités de thermorégulation comportementale. Cependant, bien qu'étant une ressource capitale, l'impact de l'eau sur leur biologie a été particulièrement sous-étudié par le passé. Notre équipe vient de montrer que la régulation de l'état de déshydratation joue un rôle clé dans les tactiques comportementales de thermorégulation chez le lézard vivipare (*Zootoca vivipara*) dans la mesure où il existe des compromis comportementaux entre les besoins hydriques et thermiques. Dans cette nouvelle étude, nous nous intéresserons aux effets du risque de prédation, simulée par la présence d'odeurs de serpents prédateurs spécialisés, sur ce compromis comportemental entre thermorégulation et balance hydrique. A cet effet, nous allons simuler une restriction hydrique modérée pendant une semaine chez 72 lézards (36 mâles et 36 femelles) réparti en trois répétitions temporelles indépendantes. La moitié des individus sera maintenu dans des terrariums arrosés trois fois par jour pour mimer les conditions les plus humides que cette espèce connaît dans la nature, l'autre moitié vivra dans des terrariums sans eau permanente et arrosés seulement le matin pour mimer les conditions les plus sèches que cette espèce rencontre dans la nature. Avant et après la manipulation, nous observerons le comportement de thermorégulation des animaux dans de grandes arènes neutres avec ou sans odeurs de prédateurs pendant deux journées. Au début et à la fin de l'expérience, les animaux seront aussi pesés et subiront une prise de sang pour évaluer leur état physiologique de déshydratation. Nous nous attendons à observer une activité réduite en situation de stress hydrique et que cette réduction soit exacerbée par la sensation de "peur" induite par la présence d'odeurs de prédateurs. Dans les conditions de cette étude, il est impossible de remplacer le modèle biologique par un équivalent cellulaire ou *in silico*. Par contre, un échantillon minimum sera utilisé en étudiant uniquement une seule classe d'âge (adulte) et on raffinerà les conditions d'élevage grâce à un enrichissement des cages et des conditions climatiques estivales habituelles du milieu naturel.

15919 Ce projet de recherche est axé sur le rôle de la protéine matricellulaire appelée hevin dans la réponse aux drogues. Ces protéines interagissent avec la matrice extracellulaire et les cellules, régulant ainsi la fonction des neurones. Deux membres de cette famille ont été impliqués dans la dépression, la réponse aux antidépresseurs et la résilience au stress. Hevin est induit après un stress chronique social dans le noyau accumbens, centre de la récompense, uniquement chez les souris résilientes. De plus, sa surexpression chez les souris susceptibles est suffisante pour inverser l'aversion sociale. Ces observations, ainsi que d'autres données sur le rôle de hevin dans la synaptogénèse et sa présence au niveau des synapses excitatrices, suggèrent que cette protéine matricellulaire est impliquée dans la plasticité synaptique sous-tendant les émotions positives et la motivation. Mes travaux de ces cinq dernières années ont permis de montrer que hevin dans le noyau accumbens régule également les propriétés renforçantes de la cocaïne.

L'objectif de ce projet est de poursuivre la caractérisation du rôle de hevin dans la réponse à la cocaïne. De plus, il est important de comprendre si les effets de hevin sont généralisables à d'autres types de drogues aux mécanismes d'action distincts. Je propose donc d'élargir cette étude au rôle de hevin sur la sensibilité et la consommation d'alcool.

Malgré l'objectif d'utiliser des modèles cellulaires pour réaliser ce projet, les effets des drogues se produisent sur l'organisme entier. Les protocoles décrits dans ce projet sont donc essentiels pour mieux comprendre l'importance des événements moléculaires causés par les drogues sur des circuits neuronaux intacts. L'effet de hevin sur la morphologie des astrocytes et des interneurons parvalbumines sera également étudiée.

Nous testerons les propriétés renforçantes, les effets hyperlocomoteurs et la consommation volontaire de drogue. Les tests comportementaux seront effectués après plusieurs manipulations moléculaires et génétiques qui permettront d'examiner avec précision le rôle de hevin dans chaque type cellulaire dans le noyau accumbens. Les études comportementales nécessiteront 640 souris (220 souris adultes du même fond génétique C57BL6/J, 200 souris Hevin-KO, 180 souris transgéniques PV-Cre et 40 souris transgéniques KO+PV-Cre).

La règle des 3R a été considérée tout au long de l'élaboration de ce projet et sera appliquée au quotidien. Pour le remplacement, nous allons utiliser des modèles cellulaires (culture neuronale et astrocytaire) pour étudier les mécanismes contrôlant et régulant hévin. Pour la réduction, des expériences précédentes ont permis de définir le nombre minimal d'animaux permettant de générer des données statistiquement solides. Enfin, concernant le raffinement, les animaux seront hébergés avec un cycle jour/nuit adapté et avec la boisson et la nourriture ad libitum. Ils feront l'objet d'un contrôle quotidien par une personne compétente. Ces contrôles doivent permettre de repérer tout animal malade ou blessé et de prendre les mesures appropriées. Par ailleurs, nous travaillons en étroite liaison avec l'équipe vétérinaire pour s'assurer que l'animal ne souffre pas face à une gêne, une détresse, une douleur ou une blessure. Si un animal est en souffrance, alors, il sera rapidement euthanasié. Pour nos chirurgies, nous utilisons les anesthésiques suivant, kétamine et xylazine dont la durée d'anesthésie est idéale pour la durée de la procédure chirurgicale. Nous utiliserons le carprofen dans l'eau de boisson en tant que procédure analgésique post-opératoire.

Les protéines matricellulaires représentent un nouveau courant de recherche qui peut amener à comprendre comment les individus s'adaptent aux drogues. Cette recherche est particulièrement novatrice et prometteuse. On est fondé à en attendre des bénéfices pour une meilleure compréhension des désordres psychiatriques en particulier des troubles de l'addiction, mais également permettre une connaissance renouvelée de la plasticité et par la même des bases de l'apprentissage et de la mémoire.

15920 Les oligodendrogliomes font partie des tumeurs cérébrales primitives les plus fréquentes et sont souvent associées à un mauvais pronostic. Ces tumeurs sont toutes mutées sur le gène IDH1 et nous avons récemment mis en évidence des mutations sur les gènes CIC et TCF12 dans une partie de ces tumeurs. Notre projet a pour but d'étudier l'impact de ces altérations individuellement ou en association pour déterminer la combinaison minimale nécessaire à la formation d'oligodendrogliomes. A l'aide de lignées de souris transgéniques, nous déterminerons les fonctions des gènes CIC et TCF12 dans les cellules souches neurales et les précurseurs d'oligodendrocytes, qui représentent les cellules d'origine des oligodendrogliomes. Notre projet devrait permettre l'établissement de nouveaux modèles murins d'oligodendrogliomes très proches de ceux observés chez les patients.

La règle des 3R a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée 1) remplacement, les études *in vitro* et sur animaux invertébrés ne permettent pas l'étude de comportements complexes le rongeur est donc une des espèces les plus appropriées pour ce type d'étude. 2) réduction, le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum pour nous permettre de générer des données statistiques solides 3) raffinement la qualité du réveil sera appréciée pour détecter toute anomalie potentielle de la procédure anesthésique. Les animaux seront surveillés quotidiennement et sacrifiés dès que des points limites détaillés infra sont atteints. Le nombre d'animaux par cage respectera la législation sur la protection des animaux de laboratoire Nous utiliserons un nombre total de 808 souris pour ce projet.

15921 L'autophagie est un processus physiologique qui régule l'homéostasie cellulaire. L'autophagie est conservée au cours de l'évolution et caractérisée par une importante accumulation de vacuoles autophagiques à double membrane (autophagosomes) dans le cytoplasme des cellules. Les autophagosomes fusionnent avec les lysosomes conduisant à la digestion de leur contenu par les hydrolases lysosomales. L'autophagie est aussi un mécanisme d'adaptation cellulaire en condition de stress et son absence est souvent observée dans des maladies métaboliques, neurodégénératives et cancers. L'objectif de ce projet est d'évaluer l'impact de l'induction de l'autophagie sur le métabolisme et le rôle de l'autophagie dans l'évaluation comportementale et la dépression chez la souris. Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des expérimentations a été mis au point afin de respecter les exigences de remplacement, réduction et raffinement pour permettre une interprétation fiable des résultats dans le respect du bien-être animal. Remplacement Cette étude ne peut être conduite qu'*in vivo* car il n'y a pas de modèles alternatifs pour l'étude de l'activation du métabolisme systémique et l'évaluation comportementale de la dépression. Nous

avons sélectionné *in vitro* des composés capables d'induire l'autophagie. Nous avons besoin de réaliser des expériences *in vivo* chez les souris afin de pouvoir confirmer nos données obtenues *in vitro*. Pour la réalisation de cette étude, nous effectuerons des expériences d'induction de l'autophagie avec les molécules sélectionnées chez la souris en présence et/ou absence de différents régimes alimentaires (normal ou gras). De plus, nous évaluerons les effets de ces traitements induisant l'autophagie sur le comportement des animaux. Réduction Ce projet, d'une durée maximale de 5 ans, prévoit 4 procédures et impliquera l'utilisation de souris immunocompétentes (n=1560) et transgéniques (n=1080). Ce nombre d'animaux est le nombre maximal que nous envisageons d'utiliser. Nous limiterons au maximum le nombre d'animaux par groupe de façon à obtenir des résultats statistiquement fiables. Nous chercherons à regrouper les expérimentations afin de réduire le nombre d'animaux contrôles. L'étude sera arrêtée si les manipulations initiales seront négatives par rapport à l'hypothèse de travail. Raffinement Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures a été mis au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et adaptés en accord avec le personnel de l'animalerie (les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum; le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification, de tunnels en cartons et bâtonnets à ronger). Les animaux seront surveillés quotidiennement pour suivre leur comportement général. Nous nous efforçons à chaque instant de raffiner nos procédures afin de garantir le bien-être des animaux en cours de procédure grâce à une surveillance attentive (points limites) et des soins adaptés (anesthésie, etc.). Des points limites appropriés seront mis en place afin d'éviter toute angoisse et détresse des animaux. Le personnel, impliqué dans ce projet, est qualifié sur le plan technique et formé en continu sur les pratiques d'expérimentation animale. Il assure également une veille scientifique continue, évitant toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature.

15922 Contexte médical et scientifique L'organisation des cellules immunitaires infiltrant les tissus inflammatoires et cancéreux en structures appelées structures lymphoïdes tertiaires (TLS) est responsable du développement d'une réponse immunitaire qui peut être favorable ou défavorable pour les patients une forte densité de TLS est associée à une aggravation de l'état de santé des patients dans le cas des maladies auto-immunes et de greffes d'organes, alors qu'elle est associée à une survie plus longue dans les maladies infectieuses et les cancers. Notre projet vise donc à définir et tester les molécules responsables de la formation et du contrôle de ces structures afin d'améliorer le traitement des patients.

Objectifs Notre objectif principal est d'identifier des molécules capables d'induire la formation de ces TLS ("inducteurs"). Cette identification permettra de concevoir des protéines capables d'induire davantage de TLS dans les cancers pour améliorer le pronostic des patients. Notre objectif secondaire est de combiner ces inducteurs avec des molécules qui accroissent déjà les réponses des patients contre les tumeurs afin d'augmenter l'efficacité thérapeutique de ces dernières chez les patients atteints d'un cancer.

Respect de la règle des 3R 1. Remplacement Il n'existe pas actuellement d'approches alternatives *in vitro* pour provoquer la formation des structures lymphoïdes tertiaires dans les situations inflammatoires et permettant d'évaluer l'impact de l'induction de ces structures sur la réponse anti-tumorale. 2. Réduction nous utiliserons au maximum un total de 1 307 souris sur quatre années dans les approches expérimentales envisagées. Ce nombre a été calculé au plus juste, afin de permettre des analyses statistiques fiables pour chaque expérience. Trente-huit expériences (chaque expérience contenant des groupes de souris allant de 5 à 10 pour la quasi-totalité d'entre elles, une seule expérience comportant un groupe de 3 souris et une seule autre de 15 souris) sont prévues sur quatre ans. Ces expériences ne répèteront pas d'expériences publiées antérieurement. 3. Raffinement transport depuis le lieu du fournisseur agréé et période d'acclimatation d'au moins une semaine avant l'expérimentation, conditions d'hébergement des souris soigneusement contrôlées (litière normale, cages ventilées individuellement, 5 animaux maximum/cage de type-III, éclairage alterné jour/nuit, régime alimentaire classique avec abreuvement automatique et enrichissement du milieu avec nids), locaux d'expérimentation agréés, surveillance quotidienne des

animaux en cours d'expérimentation, expériences arrêtées dès les premiers symptômes comportementaux et physiologiques d'une santé altérée apparaissant chez les souris (motricité affectée, perte de poids, vivacité, mobilité, aspect du poil et détresse respiratoire). Un tableau de suivi du poids sera mis en place pour permettre l'euthanasie la plus précoce possible par dislocation cervicale dès l'apparition de ces symptômes.

Les instillations intra-nasales (i.n.) seront réalisées sur des souris anesthésiées puis remises dans leur cage au moment du réveil contrôlé visuellement. L'injection par voie intraveineuse (i.v.) sera réalisée dans la veine caudale préalablement dilatée.

L'analyse de la croissance tumorale sera réalisée par imagerie IVIS chez des souris anesthésiées. Modèles d'étude deux modèles seront utilisés le premier consistera à induire une inflammation pulmonaire très modérée par inhalation d'une molécule d'origine bactérienne ou une souche bactérienne inactivée, classiquement utilisées pour étudier les cellules de l'immunité dans un environnement aérien inflammatoire. Le second consistera à créer des masses tumorales dans les poumons des animaux, ce qui provoque une inflammation accompagnant la croissance tumorale. Ces deux types d'inflammation sont accompagnés de l'apparition de structures lymphoïdes tertiaires que l'on peut ainsi étudier en termes de formation, de maintien, et d'impact sur l'immunité, notamment anti-tumorale dans le second modèle.

15923 De nombreux marqueurs d'agressivité des cancers ont été mis en évidence et utilisés pour prédire le taux de récurrence et/ ou la réponse aux traitements. La tétraspanine 8 (Tspan8) est une protéine qui peut entrer dans la catégorie des biomarqueurs d'agressivité notamment pour le mélanome, le cancer du sein, de la prostate et le cancer colorectal. Le statut en Tspan8 d'une tumeur peut donc être d'intérêt dans le suivi des patients. Nous avons ainsi démontré que nous pouvions utiliser un anticorps (Ts29.2) radiomarqué ciblant cette protéine pour mettre en évidence et traiter des tumeurs du colon. Nous développons actuellement des fragments d'anticorps (Ac) dont la petite taille est plus adaptée pour pénétrer dans les tumeurs solides. Ce projet testera la possibilité de visualiser par imagerie scintigraphique des tumeurs colorectales exprimant ou non cette protéine en utilisant des fragments d'anticorps radiomarqués.

Le nombre d'animaux inclus dans ce projet a été optimisé conformément à la règle des 3Rs (Remplacement, Réduction, Raffinement). L'ensemble du projet comprendra 120 souris Nude NMRI sur cinq années.

Ce nombre a été calculé afin de garantir une valeur statistique à l'étude menée.

En effet, de nombreuses études *in vitro* réalisées en amont ont permis de remplacer l'utilisation des animaux et de valider la reconnaissance de la Tspan8 par les fragments d'Ac développés. Cependant, ces études sur cellules ne peuvent pas se substituer aux études sur un organisme entier afin d'évaluer la distribution d'une molécule radiomarquée sur le corps entier (pharmacocinétique). Au cours de ce projet, le nombre d'animaux nécessaire est réduit au maximum en sélectionnant uniquement les expérimentations essentielles. Des cellules de cancer colorectal humain seront implantées. Les fragments d'Ac radiomarqués seront injectés aux animaux puis la pharmacocinétique de ces molécules sera étudiée.

La surveillance quotidienne des animaux permettra de déceler les premiers signaux de stress, de douleurs ou d'inconfort pour l'animal qui pourront être améliorés par l'administration d'antalgiques avant l'atteinte des points limites définis. Les conditions d'hébergement seront optimisées (portoirs ventilés, température, hygrométrie, luminosité, densité animale, enrichissement de milieu avec coton pour la nidification, bâtonnet de bois pour ronger et cabane de cachette).

15924 La mise en place et le maintien de la fertilité chez l'homme nécessite une communication efficace entre les systèmes reproducteur, endocrinien et immunitaire. Cependant la nature des effecteurs cellulaires ainsi que les bases moléculaires sous-tendant ces interactions ne sont pas clairement définies. Parmi les cellules du système immunitaire les macrophages constituent une des populations majoritaires présentes dans les gonades. Ces cellules connues pour éliminer efficacement les pathogènes jouent également un rôle essentiel dans le développement et le

maintien de l'homéostasie du testicule. Ces macrophages interagissent avec les cellules de Leydig qui produisent la testostérone ainsi qu'avec des cellules stromales structurant les tubules contenant les spermatozoïdes et leurs progéniteurs. Ce projet vise à définir les bases moléculaires et les conséquences fonctionnelles de ces interactions. Pour ce faire, nous allons utiliser une combinaison de modèles murins sophistiqués et des techniques d'imagerie avancées permettant la distinction et la visualisation des différentes populations de macrophages ex-vivo dans les tissus prélevés. Les souris recevront différents traitements gavage, prélèvement sanguin, immunisation par injections sous cutanée et greffe de cellules dans le testicule. Les résultats obtenus devraient permettre de mieux comprendre le rôle des macrophages dans les fonctions reproductives et dans la fertilité masculine.

Notre projet nécessite l'utilisation d'animaux car les approches que nous pourrions développer *in vitro* ne permettent pas de récapituler la complexité des interactions cellulaires que nous nous proposons d'étudier. Le plan expérimental de notre projet, affiné par une étude statistique du nombre d'animaux nécessaires à l'obtention de résultats fiables, a été conçu pour respecter la règle des 3 R (Réduire, Raffiner, Remplacer). Les souris sont élevées en groupes sociaux dans des environnements complexes afin de satisfaire leur instinct grégaire, de favoriser les comportements naturels et de limiter l'agressivité. Ainsi, les cages contiennent plusieurs souris et un dôme dans lequel elles peuvent créer leur nid et s'y reposer. Les cages sont contrôlées quotidiennement par 2 animaliers qui vérifient l'état sanitaire et le bien-être des animaux. Ce suivi journalier à l'aide d'une grille de score permettra une action rapide en cas de douleurs ou d'atteinte des points limites établis. Pour obtenir les résultats attendus nous prévoyons d'utiliser 523 souris sur une période de 3 ans.

15925 L'embolisation artérielle est une intervention thérapeutique de radiologie interventionnelle, consistant à obstruer une artère en injectant un produit ou en utilisant un dispositif médical. Elle permet d'arrêter le flux sanguin qui constitue ou qui nourrit une lésion, ou de boucher une lésion portée par l'artère que l'on veut emboliser. La nature des lésions à emboliser est très variable il peut s'agir de malformations congénitales des vaisseaux, de lésions secondaires à un traumatisme ou de tumeurs bénignes ou malignes. L'embolisation est réalisée à l'aide de matériaux choisis selon la nature de la lésion petites particules solides (coils, plugs, microsphères), liquides qui se solidifient dans la lésion (colle), ou petits ressorts métalliques (stent).

La technique utilise un cathéter introduit au niveau de l'artère fémorale, qui va être dirigé sous rayons X vers l'artère à traiter par l'injection du matériau.

Ce projet a pour but l'évaluation d'agents d'embolisations divers, leur utilisabilité ainsi que leur efficacité.

L'embolisation est une pratique courante en clinique permettant une alternative à la chirurgie qui est invasive, douloureuse et parfois non réalisable. Cette procédure permet une récupération beaucoup plus rapide pour les patients et une durée d'hospitalisation plus courte. Dans ce contexte, proposer aux praticiens des solutions diverses répondant à toutes les utilisations potentiellement éligibles à l'embolisation est un problème de santé publique. Seule l'expérimentation *in vivo*, mimant le plus fidèlement la vascularisation humaine permettra de répondre à ce défi par l'évaluation préclinique des nouveaux agents d'embolisations.

Un premier tri des agents potentiellement intéressants est fait à partir des mesures physico-chimiques et des techniques *in vitro* (méthode de flux) pour ne sélectionner que les plus prometteurs. Le projet sera conduit sur des lapins New Zealand, avec un nombre d'animaux compris entre 60 et 720 pour la totalité du projet (5 ans).

L'expérimentation *in vivo* est réalisée par du personnel expérimenté. Pour éviter toute douleur, les embolisations se feront sous anesthésie générale avec des antalgiques pendant toute la durée de l'intervention.

Les résultats acquis chez un même animal permettront de répondre à plusieurs questions scientifiques (pharmacocinétique, biodistribution, imagerie) afin de raffiner le nombre total d'animaux. Selon la réglementation, nous assurons également un suivi quotidien des animaux

permettant d'anticiper l'atteinte d'un point limite et nous avons mis en place un hébergement enrichi selon les normes de la réglementation.

Enfin, des points-limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

A terme, les résultats de ce projet pourraient permettre d'identifier de nouveaux agents d'embolisation pour des besoins médicaux non encore satisfaits, et/ou d'améliorer les solutions mises actuellement à la disposition des praticiens.

15926 La Dystrophie Myotonique de type 1 (DM1) est une maladie génétique causée par l'élongation anormale d'une séquence répétée (CTG) dans le gène DMPK. Cette maladie touche tout l'organisme mais est particulièrement caractérisée par une myotonie (défaut de relaxation musculaire), une faiblesse musculaire progressive, des troubles cardiaques ainsi que cognitifs. Au niveau cellulaire, la présence de la mutation va mener à l'expression d'ARN messagers DMPK (copie mobile de l'ADN permettant d'amener l'information des gènes à l'ensemble de la cellule) anormaux. Ces messagers mutés vont s'accumuler dans le noyau des cellules, provoquer une dérégulation globale et toxique des mécanismes cellulaires et, au final, amener à l'apparition des symptômes chez les patients.

Actuellement il n'existe pas de traitement pour cette maladie. Cependant des approches thérapeutiques basées sur l'utilisation d'oligonucléotides antisens (petits bouts d'ADN synthétiques qui peuvent se lier de manière spécifique à des séquences d'ADN ou ARN présentes dans les cellules. Ces oligonucléotides peuvent être modifiés chimiquement pour augmenter leur efficacité, leur pénétration dans les tissus et réduire leur potentielle toxicité), ciblant directement les ARN messagers DMPK mutés afin d'inhiber leur toxicité ont montré des résultats prometteurs dans des cellules en culture et dans des modèles murins de la maladie.

L'objectif de ce projet est i) d'évaluer *in vivo* l'efficacité d'une nouvelle génération d'oligonucléotides à l'aide d'un modèle murin de la DM1 (modèle HSA-LR), ii) d'optimiser les conditions d'injections (dose et fréquence), iii) étudier l'effet à long terme du composé sur l'organisme et, finalement identifier un candidat capable d'aller en essai clinique.

Le projet ainsi proposé a été établi en conformité avec les exigences de la règle des 3Rs

- Dans un objectif de -remplacement-, une sélection *in vitro* des séquences dans des modèles cellulaires de la maladie sera effectuée avant toute utilisation dans un organisme vivant. Cependant l'évaluation *in vivo* de l'efficacité de P-PMO-CAG comme approche thérapeutique nécessite d'avoir recours à des modèles de souris transgéniques qui expriment la mutation DM1 et reproduisent la pathologie au niveau moléculaire et surtout physiologique. Ainsi, les ASO montrant une forte efficacité sans effet délétère seront injectés à différentes doses par voie systémique dans des souris DM1 afin de vérifier la correction des anomalies moléculaires associées à la maladie. Si une correction est observée, alors les conditions d'injection pour trois composés candidats seront optimisées (nombre et fréquence) afin d'obtenir la meilleure efficacité à la dose la plus faible possible. Puis les effets obtenus avec le protocole optimal seront analysés à des temps plus tardifs pour évaluer l'efficacité à long terme et l'impact sur l'organisme. Si les résultats sont positifs, un maximum de 656 souris (544 souris DM1 et 112 souris wild-type) sera inclus dans le projet sur une durée de 5 ans.

- Afin de -réduire- et d'optimiser le nombre d'animaux, le protocole d'étude proposé a été développé avec une réduction du nombre d'animaux utilisés dans la mesure où tous les animaux issus des croisements (sans distinction de sexe) seront utilisés. De plus, le protocole est établi de manière à ce que chaque animal testé permette d'obtenir le plus de résultats possibles en physiologie, biologie moléculaire, histologie et ce, sur plusieurs tissus. Enfin ce projet se déroulera en plusieurs étapes. Ainsi la réussite de la première étape détermine la poursuite, la mise en place et l'utilisation d'animaux supplémentaire prévue dans la seconde étape, et ainsi de suite.

- Finalement, dans le but -raffiner- le protocole et en conformité avec la réglementation, toutes les précautions seront prises afin de réduire à son maximum le stress et la souffrance animale. L'entretien des souris ainsi que les différents protocoles expérimentaux seront assurés par du personnel qualifié et le bien-être des animaux sera amélioré par la mise en place d'un

enrichissement de milieu. Des modifications importantes de comportement laissant supposer une douleur ainsi qu'une perte de poids de 20% seront considérés comme critères d'arrêt en cours d'expérimentation et conduiront à l'euthanasie des animaux concernés.

15927 Lors du processus de cicatrisation à la suite d'opérations chirurgicales, deux tissus ou deux organes initialement séparés peuvent se retrouver reliés par des connections fibreuses anormales. Ce phénomène, plus connu sous le nom d'adhérences post-opératoires, constitue une source de complications dans plusieurs spécialités chirurgicales. Elles touchent entre 60 et 90% des patients opérés notamment en chirurgie digestive et gynécologique.

Ces adhérences sont génératrices, dès le 3ème jour post-opération, de complications pour le patient avec une diminution de la qualité de vie liée notamment à des douleurs chroniques. Elles représentent un coût économique important car jusqu'à 1/3 des patients sont réadmis à l'hôpital pour des interventions secondaires consécutives à la présence de ces adhérences.

En chirurgie orthopédique, ce problème est également récurrent plus particulièrement en chirurgie tendineuse du membre supérieur entraînant une perte de mobilité. Actuellement l'absence de solutions validées oblige parfois le chirurgien à réaliser des interventions itératives de ténolyse (libération chirurgicale des adhérences).

Dans le cadre d'un projet de recherche dans un laboratoire de chimie des polymères, un nouveau matériau biodégradable a été développé. Inséré lors de la chirurgie, il permettrait de prévenir la formation de ses adhérences. Il s'agit d'un polymère résorbable et biodégradable, non toxique et dont l'efficacité *in vitro* a été démontrée.

La poursuite de ce travail nécessite de tester ce matériau en conditions physiologiques et d'étudier *in-vivo* chez le rat la biocompatibilité, la dégradation et l'efficacité du matériau. Le protocole d'étude suit la norme ISO 10993-6 d'évaluation des effets locaux après implantation de dispositifs médicaux. Les travaux expérimentaux seront menés sous anesthésie générale par une équipe de chirurgiens orthopédistes expérimentés. Le matériau se présentera sous la forme d'une membrane, de taille 8*6mm, qui enrobera et sera maintenue autour du tendon calcaneal (Achilles) de la patte postérieure du rat après incision de celui-ci. Trois groupes d'étude seront comparés un groupe témoin, un groupe avec la membrane à tester et un groupe contrôle avec une membrane commerciale déjà utilisée en chirurgie viscérale et gynécologique. Chaque groupe sera composé de 15 rats soit un total de 45 rats. Une première phase d'analyse est prévue à 15 jours sur 7 rats par groupe et une autre à 3 mois post-chirurgie sur les 8 rats restants dans chaque groupe. La phase d'analyse précoce à 15 jours permettra d'évaluer la présence/absence d'adhérences ainsi que la dégradation du biomatériau. La phase tardive permettra d'étudier la réponse tissulaire induite par le biomatériau et la cicatrisation du tendon par des études histologiques et biomécaniques.

Afin de réduire le nombre d'animaux, la patte non opérée servira de contrôle. Des tests statistiques ont permis de choisir le nombre d'animaux nécessaires pour avoir un résultat statistiquement interprétable. Un suivi post-opératoire sera réalisé avec administration d'antalgiques pour éviter toute souffrance de l'animal. Une surveillance quotidienne des animaux sera mise en œuvre afin de veiller à leur bien-être.

Cette étude menée sur l'animal est indispensable pour prouver l'efficacité de notre biomatériau et ainsi pouvoir envisager son utilisation en clinique.

15928 Exploiter le système immunitaire pour reconnaître et détruire les cellules tumorales a été l'objectif central de l'immunothérapie contre le cancer. Au cours des dernières années, il y a eu un intérêt accru pour l'optimisation de cette technologie afin d'en faire un traitement cliniquement réalisable. L'une des principales modalités de traitement dans l'immunothérapie du cancer a été la thérapie cellulaire adoptive. En utilisant cette approche, des cellules souches hématopoïétiques ou des cellules T cytotoxiques spécifiques à une tumeur ou des cellules « Natural Killer » sont perfusées chez des patients cancéreux dans le but de reconnaître, de cibler et de détruire des cellules tumorales. L'immunothérapie adoptive a montré récemment des résultats extrêmement prometteurs en utilisant des cellules modifiées, en particulier des cellules T portant un récepteur d'antigène

chimérique. Dans ce projet, nous allons utiliser différentes stratégies de développement de cellules artificielles afin de les rendre plus efficaces contre les tumeurs et moins toxiques pour le patient. Leur efficacité sera largement testée *in vitro*. Cependant, ni les modèles expérimentaux *in vitro* ni les modèles mathématiques ne peuvent réellement remplacer les expériences *in vivo* d'immunothérapie adoptive des cellules modifiées contre les tumeurs. Par conséquent, les réponses anti-tumorales seront analysées chez des souris immunodéprimées avec des tumeurs humaines et injectées avec des cellules modifiées artificiellement en laboratoire. Ce modèle de souris immunodéprimée a été choisi pour éviter le rejet des cellules humaines.

Les expériences utilisant ce modèle animal proposées vont permettre d'identifier de nouveaux mécanismes anti-tumoraux et de nouvelles méthodes de traitement qui seront directement applicables dans le domaine d'immunothérapie des cancers.

Pour l'ensemble du projet, le nombre de souris nécessaires faisant l'objet de la présente demande sera de 8130 souris. Toutes les précautions seront prises pour réduire le nombre d'animaux utilisés, tout en assurant une valeur significative des résultats obtenus. En accord avec les recommandations internationales dans le domaine de la cancérologie, les animaux sont suivis quotidiennement afin d'assurer leur bien-être et les expérimentations sont arrêtées avant la souffrance des animaux selon des points limites listés dans une grille de score.

15929 Le présent projet s'inscrit en complément d'une étude précédemment réalisée dont l'objectif était d'évaluer l'intérêt et l'innocuité de l'emploi d'une molécule thérapeutique innovante (produit A) dans la prise en charge de la tendinite chez le cheval. En effet ces pathologies représentent encore aujourd'hui une des causes les plus fréquentes d'arrêt de carrière et de baisse de performances chez les chevaux de sport et de courses. Outre les conséquences sur le bien-être animal et la carrière sportive de ces athlètes, les tendinites génèrent des pertes économiques majeures directes et indirectes pour la filière équine.

L'objectif du développement de ce nouveau traitement est de cibler la phase aigüe de la tendinite caractérisée par des processus pathologiques vasculaires intra-tendineux, et pour laquelle il n'existe à ce jour aucune thérapie spécifique.

Cette étude préliminaire a permis de développer un produit A spécifique du cheval. Elle a également permis de réaliser une étude de tolérance qui n'a pas mis en évidence d'effet secondaire du produit A étudié.

Un test d'efficacité du produit A sur la cicatrisation de la tendinite chez le cheval, a également été mené lors de ce premier projet, sur 2 lots de 7 chevaux, pour lesquels une tendinite avait été induite chirurgicalement. Les résultats de ce test ont permis de confirmer la pertinence du suivi échographique longitudinal qui est apparu comme le critère d'évaluation le plus fiable pour l'évaluation de l'effet de la thérapie étudiée sur la cicatrisation tendineuse. Les résultats obtenus sont en faveur d'un effet bénéfique du produit A évalué, mais du fait notamment d'une variabilité inter-lot inattendu de certains résultats, il est nécessaire d'élargir l'échantillon étudié pour valoriser les résultats déjà obtenus, en permettant une validation statistique. Cette étape est incontournable pour envisager le passage aux essais cliniques. C'est dans ce contexte que le présent projet est envisagé, afin de réaliser un dernier test d'efficacité sur un lot de 7 chevaux.

Conformément au principe de raffinement, et comme la première étude a permis de démontrer que le suivi échographique était le critère le plus pertinent pour l'évaluation de l'effet du produit il est décidé de ne conserver que ce paramètre d'étude afin de limiter les procédures sur les chevaux. Ainsi comme aucun examen post-mortem n'est envisagé, grâce aux résultats de la 1ère étude, les chevaux seront gardés en vie et placés en fin de protocole. Enfin toujours concernant le raffinement, les chevaux seront au maximum hébergés en paddock (avec, abris, eau et foin à volonté) dans les conditions proches du milieu naturel. Lorsqu'ils seront en boxe (4 x 4 mètres) un contact visuel entre eux sera assuré et une mise à disposition permanente de fourrage et d'eau sera réalisée. Pour la réalisation des manipulations un effort permanent de limitation du stress va être mené en les examinant systématiquement par lots de 2 à 3 et en ayant recours à une sédanalgésie pour les

actes d'injection intra-lésionnelle. Par ailleurs chaque procédure autorise en cas de réaction locale, de douleur de l'animal, le recours à l'utilisation d'anti-inflammatoires et d'analgésiques appropriés.

Le principe de remplacement ne peut s'appliquer à notre projet car il a pour objectif de valoriser les résultats obtenus sur l'étude précédente menée sur l'espèce cible. De plus des spécificités d'espèce existent dans le cadre des facteurs du processus de coagulation et thrombolyse, il est donc important de travailler sur l'espèce cible.

Le nombre de 7 chevaux a été défini comme le nombre minimum pour s'assurer de l'exploitation statistique des résultats à venir ajoutés à ceux de la première étude. Par ailleurs pour réduire le nombre d'animaux, comme pour la première étude, chaque cheval sera son propre témoin et les deux antérieurs seront utilisés afin de limiter le nombre total d'individus.

15930 La paraplégie spastique héréditaire de type SPG11 est une forme précoce et très sévère d'affection neurologique se traduisant par une atteinte de la motricité des membres inférieurs et une atteinte mentale variablement associés à une atteinte cérébelleuse et du système nerveux périphérique. Des mutations de type perte de fonction ont été trouvées chez les patients dans le gène SPG11/KIAA1840 et rendent compte de 20% des cas de paraplégies spastiques transmises selon un mode autosomique récessif.

Dans le but de comprendre les fonctions du produit de ce gène, la spatacsine, et ainsi comprendre les mécanismes à l'origine de la pathologie chez les patients, nous étudions un modèle souris mimant l'inactivation de ce gène (Knock-out). L'étude de ce modèle au cours du temps (état clinique) et après autopsie à différents temps nous permettent de mieux comprendre les processus mis en cause afin d'envisager des voies d'intérêt thérapeutiques dans l'avenir. De plus ce modèle souris représente un outil de choix pour tester des molécules pharmacologiques afin de ralentir ou inverser le processus pathologique. Nous nous efforçons à raffiner nos expérimentations et à réduire toutes les occasions susceptibles de causer des souffrances inutiles à l'animal. Nous réduirons, dans la mesure des règles de la signification de la statistique, le nombre de souris utilisé dans chaque procédure expérimentale. La culture cellulaire de fibroblaste embryonnaire (MEF, pour mouse embryonic fibroblast) a pour objet aussi de remplacer les souris. La règle des 3R sera appliquée 1) réduction, le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum pour nous permettre de générer des données reproductibles et donc solides 2) raffinement, les méthodes sont choisies pour réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et l'angoisse 3) remplacement, les études permettant de répondre aux questions posées ne peuvent être réalisées que sur des souris transgéniques mimant les signes cliniques et les lésions neuropathologiques. Le nombre d'animaux utilisé est de 685.

15931 La barrière hémato-encéphalique (BHE) est un filtre extrêmement sélectif située entre la circulation sanguine et le système nerveux central (SNC, cerveau et moelle épinière). Afin de maintenir le cerveau en bonne santé, ce filtre contrôle l'accès des nutriments nécessaires aux neurones et l'élimination des déchets de l'activité cérébrale, et le protège contre l'entrée d'agents infectieux. Les composants essentiels de cette barrière sont les cellules endothéliales qui forment les vaisseaux sanguins elles tapissent les capillaires du côté du flux sanguin et sont reliées entre elles par des jonctions serrées qui participent à cette fonction de filtre. Cette fonction essentielle de la BHE – protection du cerveau – complique cependant le traitement thérapeutique d'un grand nombre de maladies affectant le système nerveux central car de nombreux médicaments ne peuvent pas traverser ce filtre. A l'inverse, une ouverture excessive de la BHE est responsable de maladies neuroinflammatoires comme la sclérose en plaques.

L'objectif de ce projet est de développer des outils moléculaires permettant d'ouvrir la barrière hémato-encéphalique « sur demande » en ciblant une nouvelle protéine régulatrice récemment identifiée. La possibilité d'ouvrir la BHE sur demande pourrait permettre d'améliorer la délivrance de médicaments dans le SNC pour combattre des pathologies comme les maladies neurodégénératives ou les métastases cancéreuses du cerveau.

Aucun modèle *in vitro* associant les différents types cellulaires impliqués n'existe pour étudier la BHE. Seule l'expérimentation *in vivo* permettra de caractériser les mécanismes permettant

l'ouverture réversible de la BHE et d'évaluer la pertinence de leur modulation pour des approches thérapeutiques.

Ce projet se compose de deux études complémentaires.

Dans une première étude, nous développerons des modèles de souris transgéniques dépourvues d'une protéine régulatrice impliquée dans la BHE. Son absence entraînant l'ouverture de la BHE, ces modèles nous permettront de déterminer les caractéristiques de cette ouverture au cours du temps *in vivo* par microscopie et IRM, et par analyse histologique de tissus prélevés post-mortem. Nous examinerons de la même manière le rôle de protéines interagissant avec ce régulateur dans le but d'identifier des protéines capables de renforcer la BHE, et ainsi de diminuer la progression de maladies neuroinflammatoires.

Dans une seconde étude, nous développerons des anticorps bloquant ce régulateur, permettant une ouverture « sur demande » et réversible de la BHE *in vivo* et en caractériserons les paramètres (ex. la durée). Les résultats attendus nous permettront d'améliorer la délivrance de médicaments dans le cerveau.

En conformité avec le principe des 3R

Le nombre d'animaux sera réduit au minimum, soit 1304 souris sur 5 ans 1) la taille des échantillons permettant une analyse statistique efficace des résultats a été déterminée à partir de données collectées au cours d'expériences précédentes, 2) les observations effectuées par microscopie *in vivo* et IRM permettent de suivre le même animal au cours du temps, et ainsi de limiter le nombre d'animaux nécessaires à l'étude.

Quand cela s'avèrera possible, des alternatives à l'utilisation d'animaux vivants seront utilisées. Ainsi, une fois que les cellules cibles de l'action du régulateur auront été identifiées *in vivo* chez la souris, certaines études *in vivo* seront remplacées par des études *in vitro* utilisant ces cellules en culture.

La mise en place de points limites ainsi que l'observation quotidienne des animaux permettront d'identifier et de limiter toute souffrance et douleur. Afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse des souris, l'imagerie *in vivo* se déroulera sous anesthésie générale et sur tapis chauffant et des traitements analgésiques pré- et post-opératoires systématiques seront utilisés. Des points limites ont été établis. Un score de douleur trop élevé impliquera l'euthanasie de l'animal avant la fin de l'étude.

A terme, ce projet devrait aider à mieux comprendre le fonctionnement de la barrière hémato-encéphalique et à proposer de nouvelles approches thérapeutiques pour les maladies neurologiques ou affectant le cerveau.

15932 La stimulation électrique fonctionnelle est utilisée à des fins thérapeutiques pour assister ou remplacer les contactions musculaires volontaires en appliquant des courant électriques de faibles intensité.

Plus précisément, cette technique peut être utilisée pour restaurer certaines fonctions comme la préhension, la station debout, la marche, la miction. Elle peut également être utilisée comme traitement contre la douleur.

Un des enjeux de cette étude est d'améliorer le réglage de la stimulation électrique fonctionnelle afin d'assurer une restauration des fonctions stable à long terme, avec le moins d'effets indésirables.

Le protocole décrit ici doit déterminer les meilleures configurations de détection et de stimulation du nerf, dans un modèle animal simple le lapin. Les animaux ne subiront aucun examen invalidant ou douloureux durant cette phase exploratoire.

Pour l'enrichissement du milieu, nous utiliserons des galets de cellulose compressés qui permettront de solliciter l'instinct de rongeur de l'animal ainsi que de mâcher, s'amuser. Il permet de concilier attractivité pour le lapin et praticité pour le technicien animalier. Ce produit permet de développer l'activité d'exploration de l'animal, et participe à son bien-être. En enrichissant le milieu, ce galet naturel réduit les comportements anormaux tels que l'agressivité ou l'apathie.

Le protocole décrit ici doit déterminer les meilleures configurations de détection et de stimulation du nerf, dans un modèle animal simple le lapin. Les animaux ne subiront aucun examen invalidant ou douloureux durant cette phase exploratoire.

20 lapins seront utilisés dans ce protocole.

Règle des 3R

Remplacement : Nous visons une application clinique à moyen terme. L'étape de validation chez l'animal est indispensable. Le cadre normatif récemment renouvelé (RDM Européen mai 2017) concernant les dispositifs médicaux implantables actifs impose de façon encore plus strict des preuves pré-cliniques avant tout essai sur l'homme. Le nerf sciatique du lapin est suffisamment proche en taille et composition des nerfs du membre supérieur de l'humain pour permettre d'utiliser des électrodes identiques.

Réduction : Nous incluons un maximum de 20 animaux. Une phase préliminaire inclura 6 animaux maximum afin de valider la faisabilité technique de l'étude.

La phase exploratoire suivra alors, impliquant un maximum de 14 animaux, afin d'évaluer la reproductibilité des méthodes proposées.

Raffinement : Notre plateforme expérimentale et nos appareils sont testés et validés avant les expérimentations (mesures à l'oscilloscope dans du serum physiologique), le stimulateur et les électrodes de stimulation sont identiques à ceux que nous utilisons en peropératoire chez l'humain.

15933 Au sein du noyau d'une cellule, l'ADN n'est pas libre mais enroulé et condensé autour de protéines architectes appelées histones. A la fois l'ADN et les histones peuvent subir des modifications biochimiques naturelles, aussi appelées marques épigénétiques, qui modulent l'expression des gènes associés, sans changer leur séquence ADN. Comprendre comment ces marques interagissent entre elles pour définir le programme d'une cellule est un enjeu majeur en développement. Parmi ces marques épigénétiques, la plus connue et la plus répandue est certainement l'addition d'un groupement méthyl sur l'ADN, qui a en général un effet de mise sous silence des gènes. Ce projet vise à comprendre les conséquences épigénétiques profondes de la méthylation de l'ADN, qui se produit dans la première semaine de l'embryogenèse de la souris et dans la deuxième semaine de l'embryogenèse humaine, mais dont les répercussions peuvent se faire sentir toute la vie.

Les profils de méthylation de l'ADN sont mis en place très tôt au cours du développement de l'embryon, puis stablement maintenus dans tous les tissus. Dans le cadre de l'étude d'un gène important pour le développement, nous avons récemment mis en évidence une nouvelle fonction pour la méthylation de l'ADN : elle est nécessaire à l'activation de ce gène. Nous utiliserons un système de culture cellulaire contrôlé, qui reproduit la vague de méthylation de l'ADN que connaît l'embryon. Le but de ce projet est de tester la fonction des gènes candidats les plus prometteurs dans le contexte du développement de la souris. Les expériences préalables *ex vivo* permettent de limiter le nombre d'études *in vivo* et d'en affiner la portée.

Pour ce faire, nous allons utiliser des souris contenant un transgène comme "éditeur épigénétique", qui provoque la déméthylation de l'ADN. Nous allons les croiser avec des souris exprimant des transgènes qui vont cibler la déméthylation avec précision sur nos loci candidats. Nous allons utiliser trois lignées de souris transgéniques distinctes à croiser avec la lignée "éditeur épigénétique" (quatre lignées au total). Nous observerons comment la déméthylation de l'ADN affecte l'expression des gènes pendant le premier tiers du développement embryonnaire et 3 jours après la naissance. En se basant sur nos études précédentes, 72 souris seront nécessaires pour réaliser ce projet et produire des résultats fiables. L'utilisation à des fins expérimentales des souris ayant servi à la reproduction permettra de réduire le nombre d'animaux à élever. La litière sera enrichie avec du coton. Même si aucun phénotype dommageable n'est attendu l'état général des souris sera suivi quotidiennement. Nous nous attacherons donc à respecter la règle des 3 R.

15934 Les produits de santé (médicaments, dispositifs médicaux, etc.) constituent un élément clé dans la dispensation de soins de qualité aux patients. En effet, 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, par nature, ils sont destinés à être mis en contact avec le corps humain et peuvent donc entraîner des effets secondaires au niveau du site d'implantation des dégradations importantes des tissus environnants peuvent nécessiter une ré-intervention chirurgicale. Des séquelles fonctionnelles peuvent en résulter dans les cas les plus graves. L'innocuité des produits de santé doit donc être testée pour garantir le bon rétablissement des patients après chirurgie. Par ailleurs, tout produit de santé se doit d'être efficace lors de son utilisation clinique.

Il est donc impératif, comme le souligne la réglementation (ex directive 2007/47/CE, 21 CFR 820...), de prouver l'efficacité des produits de santé et de réduire au minimum le risque que des réactions indésirables se manifestent avant de proposer un produit sur le marché. Notre société est fortement engagée 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 ni de couvrir l'ensemble des risques toxiques incombant aux produits de santé ni d'en tester intégralement l'efficacité, 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.

Dans ce projet, il s'agit principalement d'évaluer la performance de produits de santé utilisés en chirurgie maxillo-faciale (ex implants / substitut osseux dentaires...). Lorsque la législation et les normes en vigueur imposent d'assurer ces évaluations sur des modèles animaux, les espèces porcines et canines sont les modèles de référence en chirurgie dentaire. Les petits ruminants peuvent également être utilisés dans des cas particuliers de chirurgie maxillo-faciale.

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 500 chiens, 150 porcins, 80 ovins et 20 caprins.

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). Pour les porcins et les chiens, une transition nourriture solide/nourriture molle est réalisée au cours de la période d'acclimation. Seule une nourriture molle est ensuite distribuée (de la chirurgie jusqu'à la fin de l'étude).

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 porcins et les chiens, si l'hébergement individuel est requis et justifié scientifiquement à partir de la période post-opératoire, des contacts visuels, olfactifs, auditifs voire tactiles entre congénères sont maintenus grâce à la structure des compartiments. Des enrichissements adaptés sont disponibles pour les chiens et porcins. Enfin, de la musique est diffusée en salle d'hébergement.

Un comité d'éthique et une structure du bien-être animal intégrant plusieurs vétérinaires travaillent à temps plein de façon à veiller à l'application du meilleur niveau de soin.

15935 La mesure de bio-impédance ('bio-electrical impedance analysis', BIA) caractérise l'impédance électrique d'un tissu, qui est liée à sa teneur en eau et ainsi à sa teneur en gras. Cette technique a été largement utilisée pour des applications médicales, en particulier pour caractériser l'évolution de l'état de santé de patients pour certaines conditions ou pathologies métaboliques. Chez les poissons, le BIA est utilisé pour évaluer le teneur corporel en eau et en gras des individus et populations sauvages, car la mesure est relativement simple à mettre en œuvre, peu coûteuse, et ne demande pas le sacrifice de l'animal. De nombreux travaux expérimentaux montrent que le BIA est une mesure intégrative susceptible de refléter un grand nombre de processus biologiques qui

affectent les teneurs en eau et en gras des tissus. En particulier, des processus à long terme chez les poissons, tels que la croissance et les variations de l'état nutritionnel ou reproductif. Il serait d'un grand intérêt de mesurer ces processus au sein des populations sauvages, par exemple le long des migrations des poissons en haute mer. Cela requiert le développement d'un capteur, implanté en contact avec les tissus et relié avec une balise, pour mesurer la bio-impédance in situ. Des expérimentations sur des espèces modèles, en milieu contrôlé, sont nécessaires pour mieux comprendre comment façonner de tels capteurs. L'objectif du présent projet serait d'évaluer la biocompatibilité de certains métaux qui pourraient former les électrodes du capteur. Les métaux seront implantés en contact avec le muscle squelettique d'une espèce modèle, le bar (ou loup) *Dicentrarchus labrax*, un poisson emblématique en Méditerranée et important en pisciculture.

Les protocoles suivent la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner) :

Remplacer : Il fallait impérativement que cela soit des poissons de forme et taille importante avec une attitude de nage similaire au thon mais nous avons remplacé le thon par le bar en élevage, en raison de la quasi impossibilité d'accéder à ce type de poisson en élevage contrôlé.

Réduire : Le nombre d'individus utilisé (N = 28) est le minimum nécessaire afin de permettre une analyse histologique des réponses des tissus d'un téléostéen aux métaux. Plusieurs métaux seront implantés sur le même individu, qui sera son propre témoin. En effet, 4 temps sont nécessaires pour suivre la progression de l'inflammation (1 l'inflammation réactionnelle à l'implantation et la chirurgie (48h), la cicatrisation (1 semaine et 1 mois) et le temps présumé de la mesure in situ (6 mois). Pour chaque temps nous avons 7 poissons. Deux sont des duplicatas de témoin positif avec le tungstène qui nous servira de contrôle d'inflammation aiguë. N'en faire qu'un ne permettrait pas d'identifier d'éventuels artefacts individuels. Afin de pouvoir analyser la BIA sans être influencé par la réaction au tungstène, il fallut implanter les électrodes dans d'autres poissons. La zone d'insertion de l'électrode pouvant influencer le frottement et donc l'inflammation il faut tester plusieurs zones d'insertion (3 zones à gauche ou à droite) pour les 4 électrodes. Afin de limiter le nombre nous avons implanter plusieurs électrodes dans le même poisson et avons limité à 5 le nombre de poisson pour les électrodes test

Raffiner : Tout a été mis en place dans le cadre des procédures pour limiter la souffrance et le stress des animaux pendant la procédure d'implantation sous-cutanée des métaux, par des procédures d'anesthésie optimales (1 poisson après l'autre transfert dans les bacs de proche en proche). Après les implantations, les poissons seront conservés dans la station de recherche en pisciculture, à des densités optimales, dans des bassins isolés des perturbations humaines, dans une salle avec photopériode réglée et illumination réduite.

15936 Les facteurs de transcription jouent un rôle clef dans le contrôle de l'expression génique aussi bien pendant le développement embryonnaire que chez l'adulte. Les patients mutés pour le facteur de transcription HNF1B sont atteints de diabète ainsi que de malformations des reins et du tractus urinaire. Chez ces patients, une déficience de ce facteur de transcription est impliquée dans 30% des malformations et représente donc un enjeu majeur en génétique clinique.

Dans le cadre de cette étude, nous nous attacherons à élucider le rôle de HNF1B chez l'animal adulte. En effet, des travaux récents indiquent que l'absence de ce facteur chez la souris adulte entraîne rapidement des lésions rénales qui aboutissent à une fibrose rénale. Or, la fibrose rénale chez l'homme est la voie qui conduit à une insuffisance rénale chronique. C'est pourquoi connaître les mécanismes précoces à l'origine de la fibrose rénale est d'une importance majeure dans le domaine de la santé publique.

Une des voies potentielles conduisant à cette fibrose implique le système rénine-angiotensine rénal (RAR). Cette étude vise à comprendre l'origine moléculaire de l'effondrement du système RAR chez ces souris ainsi que d'en comprendre la portée physiologique. Dans le même temps, nous tenterons d'atténuer ou d'inverser le caractère fibrotique par l'administration, à l'aide de mini-pompes, des molécules impliquées dans l'équilibre du système rénine-angiotensine. Cette modalité d'administration précise et continue limite le recours à des branchements externes, à des injections invasives répétées et à des manipulations fréquentes.

Dans un contexte de recherche physiopathologique sur la maladie rénale chronique, les expérimentations *in vivo* ne peuvent en aucun cas être remplacées par des expériences *in vitro*, où les cellules sont sorties de leur environnement. En effet, la maladie rénale chronique est une maladie « systémique ». D'autre part, les analyses *in vitro* ou *in silico* ne sont pas informatives en ce qui concerne l'étude de la maladie rénale chronique car trop de paramètres physiopathologiques entrent en jeu. C'est pourquoi nous avons recours au modèle animal.

Ce projet prévu pour 5 ans nécessitera au total 80 souris utilisées dans 2 procédures

- Inactivation du gène Hnf1b par gavage au tamoxifène
- Perfusion d'Angiotensine par mini-pompes osmotiques

Les nombres d'expériences et de répétitions sont limités au minimum pour effectuer des tests statistiques probants (Il a été démontré que la validité de l'analyse statistique de la biochimie sanguine et urinaire requiert un minimum de 10 animaux par lot), respecter la règle des 3R et atteindre l'objectif scientifique du projet.

Dans un souci de raffinement, un suivi étroit des animaux, des points limites précoces et adaptés ainsi qu'un traitement antalgique adapté dans le cadre de la chirurgie employée sont mis en place tout au long des expérimentations. De plus les cages sont systématiquement enrichies en coton et maisons en carton.

Cette étude devrait permettre d'identifier les mécanismes moléculaires responsables d'une perte progressive de fonction rénale chez les patients présentant une mutation dans le gène HNF1B et de proposer de nouvelles cibles thérapeutiques pour ralentir la progression de la maladie rénale chronique chez ces patients

15937 Le lien entre régime alimentaire hyperlipidique et mémoire a été montré pour la première fois en 1990. Des rats nourris avec des régimes hyperlipidiques (HFD, contenant 20% de lipides) pendant 3 mois montraient de mauvaises performances d'apprentissage et de mémorisation par rapport aux rats nourris avec le régime standard. Beaucoup plus récemment, des études chez la souris ont tenté de faire le lien entre ces déficits de la mémoire et l'inflammation déclenchée par un régime hyperlipidique. Une étude a montré qu'en opposant deux régimes HFD, l'un composé de 25% de lipides et l'autre de 40% de lipides, on obtenait bien un surpoids des deux conditions mais que seule la condition la plus extrême (40% de lipides) entraînait des déficits de mémoire associés avec une augmentation des taux de molécules inflammatoires nommées cytokines et des marqueurs d'activation de cellules gliales (astrocytes et microglie) au sein du cortex cérébral. Ces résultats tendent à suggérer alors que le type de régime HFD influence grandement l'inflammation cérébrale associée, ce qui pourrait être déterminant dans les déficits de la mémoire associés. De plus une expérience récente a permis de mettre en évidence, dans un modèle d'obésité nutritionnelle après consommation d'un régime HFD (40% de lipides) chez le rat, le lien de causalité entre augmentation des marqueurs inflammatoires et les déficits de la mémoire dans une région du cerveau impliquée dans les processus de mémorisation, l'hippocampe. Enfin, en 2015, une équipe a montré qu'un déficit en acide gras oméga 3 dans le régime alimentaire de souris nourries pendant 3 mois les rendait beaucoup plus susceptibles de développer des troubles de la mémoire après induction d'une inflammation en périphérie par injection de lipopolysaccharide (LPS), un composant de la paroi bactérienne qui mime l'inflammation chez la souris. Tous ces éléments nous ont ainsi conduits à nous demander si un régime hyperlipidique enrichi en oméga 3 pouvait empêcher le développement des troubles de la mémoire, en particulier la mémoire spatiale, liés à l'obésité et l'inflammation associée.

Par ailleurs, il est bien connu que l'obésité est fréquemment associée à un phénomène d'anxiété. Des études sur le rat ont d'ailleurs montré, en 2016, qu'après 4 mois de régime HFD (40% de lipides), les rats développaient un comportement d'anxiété. Là encore, il serait intéressant de voir si la nature des lipides composant ce HFD a un effet en particulier sur l'anxiété.

Dans ce projet, nous allons donc chercher à caractériser la réponse inflammatoire induite par différents types de régimes hyperlipidiques avec des rapports Ω -6/ Ω -3 plus ou moins délétères, enrichis en beurre, tournesol, soja/maïs, colza (après 8, 12 et 16 semaines de régimes) et comparer

les phénotypes comportementaux mémoire et anxiété des souris nourries par ces différents régimes hyperlipidiques en comparaison à un régime standard.

Nous utiliserons 800 animaux âgés de 8 semaines.

Ce projet se justifie pleinement d'un point de vue scientifique et obéit à la règle des 3R

Remplacement L'étude de l'obésité nécessite un système intégré affectant simultanément plusieurs tissus (foie, tissus adipeux, pancréas, muscles et cerveau). L'obésité n'est donc pas pour l'instant modélisable *in vitro*. Il est par conséquent impossible aujourd'hui de pouvoir réaliser notre étude autre que dans un contexte *in vivo* global. En fonction des données bibliographiques, notre étude doit donc nécessairement se faire sur l'animal entier.

Réduction Le nombre de souris a été réduit autant que possible, tout en étant suffisant pour l'obtention de résultats statistiquement exploitables (basé sur nos expériences et un calcul statistique pour trouver un effet significatif). Pour évaluer le nombre d'animaux utilisés, nous avons utilisé le programme GPower 3.1. Les résultats seront analysés avec le logiciel GraphPad Prism. Nous adapterons les tests statistiques en fonction de la distribution des observables, qu'elle soit normale ou non. En cas de distribution normale, nous utiliserons des tests paramétriques (t-test pour comparer 2 échantillons, ANOVA pour comparer n échantillons). En cas de distribution non normale, nous utiliserons des tests non-paramétriques (tests de Mann-Whitney ou de Kruskal Wallis), même si ceux-ci sont moins sensibles.

Un nombre minimum d'animaux sera utilisé dans nos protocoles expérimentaux. Nous utiliserons un groupe de souris contrôles commun pour plusieurs séries d'études chaque fois que cela est possible.

Raffinement Les animaux seront hébergés dans des cages sur portoirs, avec nourriture et boisson ad libitum. Avant expérimentation, les souris seront acclimatées pendant une à deux semaines durant lesquelles les expérimentateurs les habitueront à être manipulées. A partir du début de l'expérience, les animaux seront pesés 3 fois par semaine afin de suivre leur poids. Les expérimentateurs évalueront aussi l'état général des souris quotidiennement afin de déterminer la présence ou non de signes de stress ou de souffrance (attitude soumise, dos voûté, respiration difficile, extrémités pâles, démarche anormale, diarrhée, vocalises...). En cas de stress ou de souffrance, les animaux seront soignés selon la sévérité de la douleur observée et en cas où les signes de souffrance persisteraient, les animaux souffrants seront euthanasiés. Une fiche d'observation et une grille d'évaluation de l'état de nos souris ont été établies.

15938 L'une des fonctions principales du colon est d'abriter une importante quantité de microorganismes essentiels à la digestion, et d'absorber les liquides afin de limiter les pertes d'eau de l'organisme. La muqueuse du colon est donc constamment en contact avec des métabolites potentiellement dangereux produits par des bactéries ou des champignons. Nous voulons éclaircir comment le système immunitaire assure un rapide contrôle qualité des liquides absorbés par le colon. En situation normale, les cellules épithéliales du colon établissent une barrière physique entre le contenu de l'intestin et le sang, et n'absorbent que les fluides « sains », en particulier l'eau. En revanche, en cas de croissance anormale des champignons dans l'intestin, les toxines fongiques induisent la mort des cellules épithéliales intestinales, et les produits fongiques fuient dans la circulation sanguine, à l'origine potentielle d'un choc septique, cause de mortalité très élevée chez les patients immunodéprimés. Comment les cellules épithéliales déterminent quels produits peuvent être absorbés et lesquels ne doivent jamais passer dans la circulation ? Nous avons émis l'hypothèse qu'une population de cellules du système immunitaire, les macrophages, testait l'eau se trouvant dans l'intestin avant son absorption. Nos résultats préliminaires observés chez les patients montrent que ces macrophages forment un type spécial de protrusions en forme de ballons qui sont en contact direct avec les cellules épithéliales et le contenu de l'intestin. Au sein des tissus, les macrophages sont les cellules spécialisées dans l'échantillonnage du milieu qui les entoure et de la détection de dangers, en particulier bactéries et champignons. Dans le colon, ils pourraient donc être responsables d'échantillonner les fluides absorbés et de réduire le débit d'absorption par l'épithélium intestinal si des produits fongiques potentiellement dangereux étaient détectés.

Pour étudier la fonction physiologique des macrophages qui présentent ces protrusions dans le colon, nous avons besoin de manipuler le contenu microbien de l'intestin. Nous traiterons donc des souris avec des antibiotiques et des antifongiques et évaluerons la réponse des macrophages et des cellules épithéliales en terme d'absorption de fluide. Nous contrôlerons l'absorption intestinale par injection d'une hormone qui induit l'absorption d'eau, ou l'inhiberons en utilisant un traitement laxatif. Enfin, nous utiliserons un modèle de souris qui n'a pas de macrophages ou de protrusions pour réaliser cette étude afin de pouvoir identifier la contribution respective des macrophages et des cellules épithéliales du colon au processus de contrôle qualité des fluides absorbés.

Comprendre le fonctionnement physiologique de ce processus de contrôle qualité nécessite le recours à des manipulations sur l'animal. Ce processus se déroulant dans l'intestin et avec une implication des cellules immunitaires comme nous en faisons l'hypothèse requiert d'être testé sur un modèle mammifère, et le modèle murin est donc le plus approprié. Nous réaliserons nos expériences *in vivo* de façon à limiter le nombre d'animaux, tout en utilisant assez pour obtenir des résultats statistiquement significatifs et scientifiquement exploitables. Toutes les mesures nécessaires seront prises pour réduire la souffrance des animaux. En particulier, les animaux seront réhydratés en cas de diarrhée sévère, les sondes utilisées seront souples et couvertes de vaseline afin de ne pas endommager les épithéliums, et les souris seront anesthésiées pour les infusions. Nous utiliserons au maximum 359 animaux pour la réalisation de ce projet.

15939 Le cancer du sein est considéré comme la première cause de mortalité féminine dans le monde. De nombreuses avancées au niveau des thérapies ciblées ont permis d'améliorer la prise en charge de certains sous-types de tumeurs. Cependant, le cancer du sein triple négatif, un sous-type des cancers mammaires, est défini comme le plus agressif à cause de son fort pouvoir métastatique et de l'absence de thérapies ciblées.

Ainsi le projet propose d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques impliquées dans le processus métastatique des cancers du sein triple négatifs afin d'améliorer la prise en charge des patientes. Le rôle inhibiteur de métastase d'un gène suppresseur de tumeur nouvellement impliqué dans le sein a été déjà validé *in vitro*. La deuxième étape consiste donc à valider son effet métastatique *in vivo* sur des souris.

La stratégie consistera en une injection de cellules cancéreuses exprimant ou non le gène candidat, aboutissant à la formation de tumeurs chez les souris. Ceci permettra d'étudier l'effet de la surexpression de ce gène candidat sur la croissance tumorale et la formation des métastases à distance. Le modèle animal est établi par xénogreffe sur souris nude immunodéficente. Les cellules utilisées sont des cellules humaines HCC1937 et MDA-MB-231 chacune surexprimant ou non le gène candidat étudié. La procédure expérimentale est réalisée sous anesthésie gazeuse ou par une anesthésie chimique le cas échéant et induit peu de douleur.

Nous proposons d'étudier deux modèles animaux exprimant ou non le gène d'intérêt, ces animaux seront monitorés principalement en imagerie du petit animal.

Le nombre d'animaux inclus dans ce projet a été optimisé conformément à la règle des 3R (Réduire, Remplacer, Raffiner) et est de 236 sur 5 années. Ce nombre a été calculé afin de garantir une valeur statistique à l'étude menée. En effet, de nombreuses études *in vitro* réalisées en amont on permet de remplacer l'utilisation des animaux. Cependant, ces études sur cellules ne peuvent pas se substituer aux études sur un organisme entier. Au cours de ce projet, le nombre d'animaux nécessaire est réduit au maximum en sélectionnant uniquement les expérimentations essentielles. De plus, l'utilisation et la validation de nouvelles techniques d'imageries permettent également de réduire le nombre d'animaux. Enfin, la surveillance quotidienne des animaux permettra de déceler les premiers signes de stress, de douleur ou d'inconfort pour l'animal qui pourront être améliorés par l'administration d'antalgiques avant l'atteinte des points limites définis (aspects des points d'injection/prélèvement, perte de poids, apathie...). Si les tumeurs atteignent 10% du poids de l'animal, il sera anesthésié par isoflurane ou par une anesthésie chimique le cas échéant, puis euthanasiées par dislocation cervicale. Les conditions d'hébergement seront optimisées (portoirs

ventilés, température, hygrométrie, luminosité, densité animale, enrichissement de milieu avec coton pour la nidification, bâtonnet de bois pour ronger et cabane de cachette).

15940 Chaque étude de ce projet a pour objectif principal d'étudier l'assimilation d'une molécule, candidat-médicament à visée pédiatrique, chez la souris nouveau-née jusqu'à l'âge de 10 jours, lorsque cette espèce est utilisée au cours du développement non-clinique de cette molécule (pharmacocinétique). Le métabolisme des médicaments des adultes et des nouveau-nés étant différent, en particulier au niveau hépatique, il est nécessaire d'étudier l'assimilation des candidat-médicaments destinés à la pédiatrie chez des nouveau-nés jusqu'à l'âge de 10 jours.

Pour cela, au cours de chaque étude, des prélèvements sont réalisés chez l'animal après l'administration du candidat médicament.

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

Le nombre prévisionnel maximum d'animaux est de 430 souris sur 5 ans.

La conception de ce projet prend en compte la règle des 3R :

- Remplacement Dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez la souris nouveau-née car il n'existe pas de méthode de substitution (*in vitro* ou *in silico*) pour étudier la pharmacocinétique d'un candidat médicament.

Or, avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité, la toxicité et la pharmacocinétique d'un candidat-médicament. A ce jour, la souris est l'une des espèces qui est la plus adaptée à ce type de modèle d'étude.

- Réduction Un nombre minimal et homogène d'animaux par groupe est utilisé afin d'exploiter de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et afin d'avoir un nombre d'animaux suffisant pour réaliser une analyse statistique.

- Raffinement Dans ce projet, le raffinement est obtenu par

- le recours à des procédures les moins invasives possibles

- le suivi d'éventuels signes cliniques

- la recherche des points limite

- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.

15941 Notre laboratoire étudie depuis de nombreuses années les régulateurs de l'angiogenèse et de l'invasion sur des modèles cellulaires *in vitro*. L'angiogenèse est le processus de formation de nouveaux vaisseaux sanguins, intervenant dans des étapes du développement tumoral pour assurer la croissance et l'irrigation des tumeurs *in vivo*. Les cellules tumorales acquièrent aussi des propriétés invasives et quittent la tumeur primaire, notamment après des traitements anti-angiogéniques. Ce processus est problématique d'un point de vue clinique dans le cas du glioblastome, un cancer du système nerveux central, car il est impossible d'avoir accès aux cellules invasives afin de circonscrire la tumeur.

Aussi, après de nombreuses expériences préliminaires *in vitro*, nous devons valider nos modèles sur un minimum d'animaux *in vivo* pour tenir compte du contexte physiologique.

Nous avons caractérisé *in vitro* l'implication de facteurs spécifiquement impliqués dans l'invasion (thrombospondin-1 ou Tsp1 et le TGFbeta). Ces molécules semblent également moduler l'invasion des cellules *in vivo* chez des patients atteints de glioblastomes. Aussi nous devons maintenant passer à un modèle *in vivo* chez l'animal pour tester cette hypothèse et évaluer le rôle de nos molécules d'intérêt dans l'évolution de cette maladie afin de définir de nouvelles cibles thérapeutiques.

Pour cela, nous utiliserons un modèle murin immunodéficient afin d'implanter des cellules tumorales humaines et ainsi reproduire au plus près les conditions de formation de ces tumeurs chez l'homme. Nous utiliserons le minimum nécessaire d'animaux pour être statistiquement significatif et

scientifiquement irréprochables. De plus, une lignée de souris immunocompétente sera utilisée pour reproduire un environnement cancéreux, la lignée MCT1 -/+. L'ensemble des expériences impliquera différents lots d'animaux, dont le total sera de 1300. Les animaux sont produits à cet effet dans une structure agréée qui tient compte de l'éthique animale et assure l'élevage et le suivi quotidien des animaux dans les meilleures conditions de bien-être conformément à la législation et la règle des 3R. En effet, afin de réduire le nombre d'animaux, nous utiliserons tous les mâles et toutes les femelles issus des croisements. Ensuite, nous ferons des analyses bioinformatiques afin d'éviter d'utiliser un nombre trop important d'animaux. Nous tiendrons aussi compte de la souffrance potentielle des animaux en administrant des anesthésiques, des analgésiques, et des mesures de maintien de la température corporelle.

15942 Ce projet a pour but d'étudier la pathogénicité du cancer colorectal.

Un précédent projet a permis d'étudier les mécanismes tumorigènes à l'origine du cancer colorectal, afin de mieux comprendre ses différents stades de développement.

Aujourd'hui ces mécanismes sont connus, l'objectif de ce nouveau projet est d'étudier l'impact d'une alimentation riche en graisses sur la composition du microbiome intestinal et les liens qui existent avec le développement du cancer colorectal. A terme, ce travail permettra de définir des recommandations nutritionnelles pour prévenir la population et réduire ses risques de développer un cancer colorectal.

Ce projet est composé de 2 études :

La première étude a pour but d'étudier l'impact d'une alimentation riche en acides gras

La deuxième étude a pour but d'étudier l'impact d'une alimentation riche en acides gras insaturés.

Ces aliments sont donc donnés aux souris tout le temps de l'étude. Puis deux composés sont administrés (l'un en intrapéritonéal, l'autre dans l'eau de boisson) aux souris pour développer le modèle de cancer colorectal. Avant et après administration des composés tests, des fèces seront prélevés pour évaluer l'altération du microbiome intestinal. A la fin de l'étude, les souris sont expédiées au chercheur dans un autre établissement utilisateur, pour réalisation des analyses nécessaires (autopsie à différents âges pour analyse des tumeurs, analyse de sang et du microbiome intestinal).

Ce projet respecte la règle des 3Rs :

REMPACER : Le projet précédent ayant été conduit chez la souris, modèle chez lequel la tumorigénèse du colon est semblable à celle observée chez l'humain, cette nouvelle étude reprend le même modèle animal. Aucune méthode de substitution n'est envisageable puisque le projet a pour objet d'étude l'organisme dans son ensemble : nutrition et métabolisme, composition du microbiome et induction de tumeur au niveau de l'intestin.

REDUIRE : Le nombre d'animaux a été réduit au strict minimum permettant d'atteindre les objectifs scientifiques. Basé sur les expériences précédentes, un total de 288 animaux a été calculé comme étant le bon effectif : 144 souris dans chaque étude pour toute la durée du projet. En fonction des résultats obtenus lors de la première expérimentation, une seconde étude pourrait être réalisée à la suite pour s'assurer de la reproductibilité des résultats ceci porterait donc à 576 le nombre d'animaux utilisés au total.

RAFFINER : Pour raffiner le bien-être des animaux, une période d'acclimatation ≥ 72 h sera réalisée à leur arrivée dans l'animalerie. Leur environnement sera adapté à leurs conditions de bien-être (température / lumière / hygrométrie / hébergement en groupe avec enrichissement). L'aliment test pouvant être plus mou que l'aliment standard, des bâtons de bois à ronger pourraient être donnés aux animaux pour leur permettre de maintenir leur comportement naturel de rongeur. Les animaux seront observés quotidiennement et des pesées seront faites pour détecter au plus tôt une dégradation de leur état général. Pour éviter toute douleur et/ou souffrance inutile des animaux, des points limites généraux et spécifiques à ce projet ont été définis dans les procédures.

15943 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 et l'accès aux meilleurs soins, dans le domaine de la santé humaine ou vétérinaire.

La réglementation exige de prouver l'efficacité et l'innocuité des produits de santé avant leur mise sur le marché

Dans ce projet, il s'agit principalement d'évaluer des produits de santé à l'aide de la technologie IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) permettant ainsi de limiter les actes techniques invasifs, sur des animaux venant de différents établissements utilisateurs, et ainsi de réduire le nombre d'animaux utilisés.

Toutes les espèces pouvant être hébergées dans nos locaux (rongeurs, lagomorphes, chiens, porcs, petits ruminants) sont susceptibles d'être inclus dans ce projet.

Les animaux venant d'autres établissements utilisateurs, des transports seront nécessaires entre nos locaux et l'établissement utilisateur d'origine : un temps suffisant sera assuré avant et après les examens d'imagerie, afin d'assurer un retour à un état physiologique stable.

Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est basé sur les recommandations des textes de référence et sur les contraintes scientifiques (nombre suffisant d'animaux pour assurer la validation scientifique des études). Les examens d'imagerie tels que l'IRM sont des méthodes qui permettent la réduction du nombre d'animaux inclus dans une expérimentation, améliorent le confort de ces derniers (procédure non invasive) et induisent une réduction des biais expérimentaux (suivi longitudinal d'un même animal).

Le nombre prévisionnel d'animaux utilisés dans le cadre de ce projet, sur 5 ans, est estimé à

- 300 Souris
- 100 Hamsters
- 300 Rats
- 100 Cobayes
- 300 Lapins
- 100 Furets
- 100 Chiens
- 100 Porcs
- 100 Moutons
- 100 Chèvres

Ce nombre pourra être inférieur en fonction des études réellement effectuées. Par ailleurs, ces animaux sont déjà comptabilisés dans les demandes d'autorisation de projet de leur établissement utilisateur d'origine.

Chaque animal bénéficiera d'une attention et de soins de qualité pendant les examens d'imagerie, mais aussi en dehors de ceux-ci, afin d'assurer un bien-être optimal.

Notre projet porte sur des procédures d'imagerie non douloureuses, mais si une procédure mise en œuvre devait provoquer une douleur chez les animaux concernés, une analgésie sera automatiquement mise en place (selon les bonnes pratiques vétérinaires et en accord avec le protocole d'étude).

Les animaux seront hébergés en groupes sociaux harmonieux sauf lorsque les contraintes de l'étude l'empêchent. Dans tous les cas, pour toutes les espèces sociales, l'hébergement individuel devra être justifié et validé par la structure du bien-être animal.

Des enrichissements standards spécifiques à chaque espèce (produits de nidification, cachettes, jouets) seront systématiquement mis à disposition des animaux.

15944 Parmi l'ensemble des déficiences physiques et cognitives qui peuvent résulter d'une lésion cérébrale (vasculaire, traumatique, etc.), les atteintes neuromotrices, à savoir le déficit moteur, la

spasticité et les modifications musculaires, tiennent une grande part dans le retentissement fonctionnel. La spasticité est définie par le consortium SPASM comme « un désordre sensorimoteur résultant d'une lésion du motoneurone supérieur et présentant une activation musculaire involontaire persistante ou intermittente ». Elle concerne classiquement les muscles anti-gravitaires, comme les fléchisseurs du coude au membre supérieur ou le triceps sural au membre inférieur. Lors d'une lésion neurologique centrale, on observe au sein du muscle devenant spastique une plasticité neuromusculaire, avec nombre de modifications de structure (type de fibre, longueur et angle de fibre) et de fonction (propriétés intrinsèques du muscle, contractilité) des fibres musculaires.

Pour lutter contre la spasticité, plusieurs outils sont utilisables. Le traitement chirurgical de choix de la spasticité est la neurectomie sélective partielle (NSP). Elle consiste en une résection partielle sélective des branches nerveuses motrices destinées à un muscle afin de diminuer la spasticité de ce dernier. Cliniquement, la NSP du nerf tibial, et en particulier des rameaux moteurs du muscle triceps sural, entraîne une diminution significative de la spasticité postopératoire, une amélioration fonctionnelle, avec des résultats qui se maintiennent jusque 2 ans postopératoires. Il n'y a, au plus long recul, aucun déficit du triceps sural, ni de rétraction du tendon calcanéen. Si elle est réalisée en pratique courante par des équipes spécialisées, les facteurs expliquant ce phénomène ne sont pas décrits. Plus largement, les conséquences de ce geste sur les propriétés fonctionnelles et structurelles du muscle ne sont pas connues.

Ce projet se basera sur l'étude

- 1) des caractéristiques structurelles et fonctionnelles du muscle soléaire chez le rat spastique, par analyse du phénotype et de la taille des fibres ainsi qu'une étude mécanique de la contractilité musculaire.
- 2) des modifications structurelles et fonctionnelles du muscle spastique après NSP. Une analyse de la marche et du réflexe de Hoffman sera également effectuée pré- et post-NSP.
- 3) de la repousse nerveuse post-NSP.

Afin de répondre aux exigences de la règle des 3R, le nombre d'animaux est estimé à 185 rats.

REDUCTION L'ensemble des procédures expérimentales nécessaires à l'accomplissement de ces études requiert un nombre total de 185 rats. Le nombre d'animaux a été réduit au maximum tout en permettant l'obtention de résultats satisfaisants (différences statistiquement observables entre les animaux traités et les animaux contrôles). Ce nombre est un maximum, mais nous veillerons à le réduire tout en permettant l'obtention de résultats satisfaisants.

RAFFINEMENT Dans tous les cas, l'ensemble des procédures expérimentales seront réalisées en limitant au maximum (durée et intensité) toute douleur et/ou stress pour les animaux, et en étant particulièrement vigilant sur les points limites.

REMPLACEMENT Il s'agit d'un projet portant sur les effets de la NSP sur les propriétés structurelles et fonctionnelles des fibres du muscle soléaire. Un tel projet ne peut être mené avec des méthodes alternatives *in vitro* ou *in silico*.

15945 Les infections des voies respiratoires sont une cause majeure de morbidité et de mortalité dans le monde. En hiver, elles représentent un réel problème de santé publique en raison de leur fréquence et de leur gravité. Les hospitalisations pour maladie respiratoire aiguë induisent un coût important et il n'y a pas à l'heure actuelle de traitement efficace disponible mis à part pour la grippe. Les principales causes de bronchiolite chez les enfants sont le virus respiratoire syncytial (VRS) et le métapneumovirus (hMPV). En outre, ces virus peuvent déclencher des exacerbations graves de l'asthme. Ces virus sont également associés à des maladies graves chez les patients à haut risque comme les immunodéprimés et les personnes âgées.

Notre projet de recherche s'orientera sur l'étude de la pathogénie du métapneumovirus et notamment sur l'impact d'une colonisation bactérienne par *Streptococcus pneumoniae*. *Streptococcus pneumoniae*, appelé également pneumocoque (SP), est une bactérie qui colonise fréquemment le rhinopharynx humain, en particulier celui des jeunes enfants. Ce portage

asymptomatique peut évoluer en infections d'intensité variable. Le pneumocoque est la cause d'infections allant d'infections respiratoires modérées à des infections invasives graves, parfois mortelles. Bien qu'il existe une vaccination obligatoire avant l'âge de 18 mois depuis janvier 2018, les infections à pneumocoque restent un problème de santé publique important au niveau mondial.

L'expression clinique des infections virales à hMPV est variable et la part immunologique et inflammatoire dans cette variabilité reste méconnue. Les surinfections bactériennes pourraient accroître la gravité de la maladie. En effet, les agents pathogènes bactériens tels que le pneumocoque sont souvent détectés chez des patients ayant une maladie sévère associée au hMPV. En outre, l'incidence des pneumococcies invasives chez les enfants est associée avec la saisonnalité des infections respiratoires. Chez la souris il a été démontré qu'une surinfection avec *S. pneumoniae* ultérieure à l'infection à hMPV augmentait la sévérité de la maladie.

Le but de la présente étude est l'analyse de l'impact d'une colonisation bactérienne sur les infections à hMPV, sur la sévérité, les exacerbations de l'asthme, la transmission, et ce en incluant le groupe à risque que sont les jeunes. Dans un deuxième temps, une prévention d'une pathogénie exacerbée sera éprouvée.

Nous avons précédemment développé des modèles animaux (souris) d'infection à métapneumovirus qui serviront de base à ce projet et nous permettent d'étudier la pathogénie de ces complications.

Ce projet inclut une procédure, « Infection expérimentale avec un virus respiratoire ou un inoculum bactérien ». Les animaux nécessaires à l'étude seront des souris (n= 519).

Règle des 3R

- procédure 1 Infection expérimentale avec un virus respiratoire ou un inoculum bactérien

Les animaux ne peuvent pas être remplacés par une méthode alternative pour l'étude d'une infection respiratoire. La mesure de l'obstruction bronchique, le site et l'ampleur de la réplication et l'induction d'une réponse immune ne peuvent être mesurées qu'*in vivo*.

Des manipulations préliminaires nous permettent cependant de restreindre le champ d'investigation *in vivo*. Par exemple, des études préliminaires réalisées *in vitro* telles que celles permettant l'identification des cytokines induites par l'infection ou celles mesurant l'activité de sialidases sur culture de cellules épithéliales, nous guident pour nos recherches sur l'animal. Elles nous permettent de réduire les groupes d'études et le nombre total d'animaux. Nous avons une expérience solide du modèle souris et connaissons la variabilité individuelle attendue pour les différents protocoles partiels. Ceci nous permet de faire une estimation statistique préalable du nombre minimum et suffisant d'animaux nécessaires afin de maximiser les chances d'obtenir des résultats scientifiques exploitables (par exemple compte tenu de la variabilité individuelle, 6-10 souris/groupe pour la mesure du titre viral). Des anesthésiques (kétamine/xylazine) seront systématiquement utilisés avant infection virale. Les inoculations seront réalisées sous anesthésie afin de diminuer le préjudice subi par les animaux. Les souriceaux nouveaux-nés auront une anesthésie légère à l'isofurane tel que recommandé (4-5% pendant 1- 2 min). Le volume d'inoculation sera restreint, 20-30µl pour les adultes, 3 µl pour les souriceaux.

L'inoculation bactérienne se fera également par voie intranasale, avec un volume restreint afin de diminuer le préjudice subi par les animaux (10µl pour les adultes, 1-2 µl pour les souriceaux, sans anesthésie afin d'éviter une inoculation des voies basses).

Tous les prélèvements d'organes sont effectués après sacrifice. De même, nous avons choisi l'euthanasie la plus adéquate pour les souris, l'injection de dolethal ou d'une surdose de kétamine/xylazine sont des méthodes de mise à mort efficace et rapide.

Des points limites ont été définis (ceux-ci sont décrits dans le projet). Les animaux seront dans ce cas euthanasiés afin d'éviter une souffrance inutile. Ces données seront marquées dans le registre relatif à l'expérimentation. Les animaux seront suivis cliniquement quotidiennement par les expérimentateurs (aspect physique/poids corporel).

15946 Depuis plusieurs années, l'intérêt s'est porté sur les propriétés régulatrices des acides aminés. Plus particulièrement, différents travaux ont montré que la citrulline, un acide aminé n'entrant pas dans la production des protéines, était un puissant activateur de la production des protéines musculaires. De telles propriétés pourraient être mises à profit dans la prise en charge de pathologies atteignant la fonction musculaire. De plus, la citrulline thérapeutique préserve la fonction cardiovasculaire, en particulier via un effet vasculaire (vasodilatateur). En parallèle, une étude réalisée chez des rats âgés dénutris et confirmée chez l'Homme sain soumis à un régime hypoprotéique, a montré que la citrulline était capable de stimuler la synthèse protéique musculaire et d'augmenter le contenu protéique musculaire.

Ce projet étudiera les effets de la citrulline plasmatique produite par une enzyme intestinale appelée OTC. En particulier, nous nous intéresserons aux effets de la citrulline endogène sur la fonction cardiovasculaire, la susceptibilité aux infarctus ainsi qu'au métabolisme énergétique myocardique.

De ce fait, nous avons choisi de travailler sur une lignée de souris génétiquement modifiée nous permettant d'inactiver spécifiquement la production intestinale de citrulline et d'en évaluer les conséquences sur la fonction cardiovasculaire ainsi que sur le métabolisme énergétique.

Dans un premier temps, nous ferons un suivi longitudinal des fonctions cardiovasculaires et du métabolisme énergétique des souris sans la production de citrulline intestinale pendant 18 mois.

Puis nous induirons un infarctus à une partie de ces souris et nous évaluerons les conséquences de l'absence de production de la citrulline intestinale sur la récupération des souris.

Le protocole a été établi pour satisfaire au mieux la règle des 3R

Remplacer L'objectif étant de mieux comprendre le rôle de la citrulline endogène dans les fonctions cardiovasculaires en général et dans des modèles de maladies cardiovasculaires, une étude *in vivo* est indispensable. Le modèle murin a été choisi pour cette étude car il est le seul connu permettant d'obtenir les modifications génétiques nécessaires à notre étude.

Raffiner L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long des procédures afin d'intervenir de manière rapide et appropriée au moindre signe clinique de douleur. De même, des points limites seront établis afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus.

Réduire Au vu d'études préliminaires et dans le but d'obtenir une puissance statistique suffisante nous permettant de répondre de manière pertinente aux questions posées par l'étude, un minimum de 12 individus par sexe et par groupe a été établi. Ainsi, un total de 144 animaux pour l'ensemble des procédures (72 souris pour un suivi longitudinal pendant 18 mois et 72 souris qui vont subir une ischémie/reperfusion).

15947 L'obésité dans la population humaine est un problème de santé publique en évolution rapide au niveau mondial le nombre de personnes obèses, c'est à dire dont l'indice de masse corporelle est supérieur à 30 (kg/m²) est ainsi passé entre 1975 et 2014 de 3,2 à 10,8% pour les hommes et de 6,4 à 14,9% pour les femmes. L'obésité est reliée au diabète et aux maladies cardiovasculaires dans l'espèce humaine.

Les traitements actuels de l'obésité consistent en des régimes hypocaloriques et en des chirurgies du tube digestif (appelées chirurgies bariatriques), tous deux assortis d'effets néfastes, les effets rebonds en fin de régime ou l'inobservance en raison d'une faim persistante pour les régimes et en complications post-opératoires pour les chirurgies de réduction de l'estomac.

Le présent projet consiste à évaluer l'efficacité et la sécurité d'une préparation qui, en se gélifiant, assure un remplissage partiel et neutre de l'estomac (à priori 70% du volume alimentaire normalement ingéré) suivant son administration orale sur la prise alimentaire volontaire de rats traités.

La première phase du projet consiste à vérifier que l'administration du produit prévue sous forme liquide 10 minutes avant le repas est effectivement applicable dans cette espèce.

Deux procédures permettent de tester que le produit peut effectivement gonfler dans l'estomac de rats. Elles nécessitent 24 animaux chacune, soit 48 animaux au total.

La 2ème phase consiste à identifier si les effets indésirables possibles (diarrhée, vomissement, confort de l'animal) peuvent être observés après une administration unique du produit. Elle nécessite 12 animaux.

La 3ème phase consiste à analyser comment le produit se comporte dans l'estomac des animaux par imagerie IRM. Elle nécessite 36 animaux.

La 4ème phase consiste à mesurer l'efficacité d'une administration quotidienne préalable au repas pendant 15 jours ou 2 mois sur la réduction de la quantité d'aliment absorbée et sur la masse corporelle. Elle sera réalisée sur des rats de poids normal (48 animaux) puis sur des rats obèses mâles et femelles (48 animaux mâles et 48 animaux femelles). Un bilan sanguin sera également réalisé avant et après le traitement de 15 jours ou 2 mois pour déterminer si le produit a amélioré l'état de santé des animaux obèses. Elles nécessitent 144 animaux au total.

Le nombre d'animaux, de 3 par groupe de phases de test et d'imagerie est aussi réduit qu'il nous semble possible de le faire : il permet de détecter une inefficacité ou une intolérance partielle de l'ordre de 33%.

Puis les groupes sont constitués de 12 animaux dans les autres phases du projet pour obtenir des résultats interprétables et robustes.

Au final, ce projet nécessitera l'utilisation de 240 rats wistar sur 4 ans. Tous les animaux seront euthanasiés à la fin du projet.

Le volume du produit plongé dans une solution à l'acidité équivalente à celle de l'estomac d'un homme a été évalué *in vitro*. Toutefois, avant tout essai sur des patients humains obèses dans le cadre d'un essai clinique, la faisabilité, l'innocuité et l'efficacité doivent être testées sur des animaux. Nous estimons que les effets indésirables de la présence du produit dans l'estomac sont improbables car il a déjà été testé chez 6 chiens. Cependant, l'étude très préliminaire chez le chien n'a pas permis de tester l'efficacité du produit sur la perte de poids mais seulement son innocuité. Toutefois, si contrairement aux chiens, des signes généraux devaient se produire de manière flagrante et répétée chez les rats, le projet serait interrompu.

Remplacement Les essais dans des modèles animaux doivent du point de vue de la protection des patients avoir fait l'objet d'évaluation de sécurité et de preuves de concept avant leur lancement. De plus, notre projet correspond à un travail de physiologie intégrée qui permettra de comprendre les communications inter-organes en particulier entre l'intestin et le cerveau contrôlant la prise alimentaire. Il n'est pas possible de recréer *in vitro* la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs cellulaires entrant en jeu.

Réduction Nous limitons au maximum le nombre d'animaux par groupe de façon à obtenir des résultats statistiquement fiables et valorisables ou publiables. Un nombre trop restreint d'animaux engendrerait des résultats trop variables et non valides. Les phases tests du projet sont réalisées sur un nombre minimum de 3 animaux et un certain nombre d'animaux quand c'est possible sont réutilisés.

Raffinement l'ensemble des procédures de ce projet vise à concilier une interprétation fiable des résultats et le respect du bien-être animal. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation. Les opérations chirurgicales (poses de pinces pour ligaturer l'estomac) et les séquences d'imagerie sont réalisées sous anesthésie.

Nous avons inclus dans toutes les procédures des grilles de suivi de poids et de la prise alimentaire des animaux avec des pesées journalières ou hebdomadaires. Nous avons défini une grille d'évaluation de la douleur avec des points limites précis lors des opérations chirurgicales.

15948 L'interleukine-2 (IL-2) à fortes doses est utilisée pour traiter certains cancers depuis plus de vingt ans. Toutefois, sa toxicité est importante et son mécanisme d'action reste mal connu. Sa faible efficacité est due en partie à l'action de l'IL-2 sur des sous-populations de cellules immunes qui ont des fonctions suppressives et qui empêchent la réponse anti-tumorale. Au contraire, une réponse anti-tumorale efficace requiert l'activation d'autres sous-populations de cellules immunes, qui répondent aussi à l'IL-2 mais via un autre récepteur. De façon intéressante, le complexe formé par

un anticorps (Ac) anti-IL-2 et l'IL-2 potentialise cette dernière et réduit sa toxicité. De plus, selon le clone d'Ac utilisé, ce complexe permet de diriger l'action de l'IL-2 sur les cellules immunes effectrices; augmentant fortement la réponse anti-tumorale. Notre objectif est d'optimiser la thérapie anti-tumorale basée sur l'IL-2 en développant des nouveaux complexes IL-2/anti-IL-2. Les Acs anti-IL-2 seront obtenus de différentes sources et ils seront complexés avec l'IL-2. Puis, la capacité de ces complexes à activer les cellules immunes sera évaluée à l'aide de tests *in vitro*. Finalement, les complexes les plus performants seront utilisés dans des modèles de tumeur chez la souris, pour évaluer leur capacité à inhiber la croissance tumorale. Le but final sera de transférer cette nouvelle thérapie basée sur l'utilisation de complexes IL-2/anti-IL-2 chez l'homme.

Ce projet découle de résultats obtenus *in vitro* à l'aide notamment de lignées cellulaires en culture. Ces traitements doivent être évalués dans un système plus physiologique représentant un organisme vivant intégré tel que la souris. Cette étape de développement pré-clinique est indispensable pour tester l'efficacité, le mécanisme d'action ainsi que la toxicité éventuellement associée à ce type de traitement afin de pouvoir envisager d'appliquer cette thérapie en clinique chez l'homme. La souris est une espèce de choix pour les expériences menées en thérapeutique du cancer et elle a depuis longtemps servi à l'étude de thérapies anti-tumorales, notamment car la physiologie de la souris est proche de celle de l'Homme.

Nous prévoyons d'utiliser environ 740 souris pour une utilisation dans des procédures expérimentales, dont 432 souris génétiquement modifiées obtenues via le maintien de lignée déjà en utilisation.

Dans un souci de raffinement, toutes les mesures seront prises pour éviter le stress et la douleur des animaux.

15949 La migraine se caractérise par des crises de céphalées accompagnées de nausées et d'une hypersensibilité à de nombreux stimuli (olfactifs, visuels, auditifs et même mécaniques tels que le toucher) traduisant les symptômes migraineux de phonophobie, photophobie, osmophobie et allodynie. L'hypersensibilité mécanique ou allodynie (stimulus mécanique léger comme le toucher ressenti comme une douleur) constitue le principal sinon le seul élément mesuré dans les modèles de migraine chez le rongeur. Il constitue le principal symptôme (avec la douleur spontanée) considéré comme le plus invalidant par les patients. Nous savons que les astrocytes (cellules nerveuses qui collaborent avec les neurones) sont significativement impliqués dans la modulation des messages nociceptifs notamment dans l'allodynie mécanique. Afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles dans la migraine, il apparaît donc nécessaire de savoir si les astrocytes jouent un rôle majeur dans ses mécanismes physiopathologiques. Sachant qu'il n'existe objectivement aucune méthode alternative pour ce type d'étude, nous proposons d'étudier l'implication de l'activité des astrocytes dans un modèle animal (rat) de migraine où l'allodynie est déclenchée par administration d'un vasodilatateur, l'isosorbide dinitrate (ISDN) connu chez l'homme pour déclencher la crise de migraine.

Le but de ce travail est de mesurer sur tissu (coupe d'encéphale), via une approche immunohistochimique, les variations d'expression d'une protéine, marqueur d'activité astrocytaire, induites par l'ISDN.

Pour ce faire, après une injection systémique d'ISDN (ou de serum physiologique, groupe témoin), les rats seront anesthésiés et soumis à des stimulations mécaniques de la face (stimulation tactile avec un filament de von Frey de 6 grammes pendant 3 minutes). Ces stimulations interviendront soit 1h soit 3h après l'injection d'ISDN. En effet, des données antérieures ont montré que le pic d'allodynie (hypersensibilité tactile) intervient à 1h pour un retour de la sensibilité à la normale 3h après injection. Après ces stimulations, les animaux seront mis à mort et les cerveaux prélevés pour la réalisation de coupes histologiques et des marquages immunohistochimiques. Ces marquages seront analysés au niveau du noyau caudal du trijumeau où sont relayés les messages (nociceptifs et non nociceptifs) en provenance de la face du rat. Il a été montré qu'un des mécanismes responsables de l'allodynie se situait au niveau de ce relais.

Le nombre de groupes de rats et le nombre de rats par groupe sera réduit au maximum tout en préservant une puissance statistique significative. Ainsi, nous utiliserons 4 groupes de rats mâles (n=8 /groupe) soit au total 32 rats. Ces groupes seront constitués selon 1 groupe ISDN stimulation à 1h comparé au groupe témoin serum physiologique stimulation 1h et 1 groupe ISDN stimulation à 3h comparé au groupe témoin serum physiologique stimulation à 3h. L'étude portera sur des rats mâles car il a été montré antérieurement pour ce modèle qu'il n'existait pas de différence significative dépendante du sexe dans l'allodynie (analyse comportementale).

Si notre hypothèse est vraie, les résultats montreront (via une analyse statistique non paramétrique) une augmentation du marquage astrocytaire chez les animaux ISDN stimulés par rapport aux animaux témoins, ce qui attesterait de façon originale de l'implication de l'activité astrocytaire dans la migraine aiguë. L'étude à 1h et à 3h est indispensable car elle nous donnera une indication sur la dynamique de l'activation astrocytaire dans le cas aigu. Il est à noter que dans le cas de la migraine chronique (injection répétées d'isdn) une activation à 1h et à 3h post ISDN a été montrée antérieurement. Les données apportées par le présent projet pourront être comparées avec celles du modèle ISDN chronique.

Dans le respect du "R" de Raffiner, il est à noter que nos animaux sont sous anesthésie générale lors des stimulations mécaniques. Concernant la période avant anesthésie, les animaux sont hébergés dans des cages standards bénéficiant d'un enrichissement social et environnemental adapté avec visites quotidiennes. De plus les animaux sont habitués pendant une semaine avant injection aux conditions d'expérience. L'expérience du présent modèle de migraine montre que les animaux ne présentent jamais de problème liés aux injections et au développement de l'allodynie mécanique qui pourraient altérer leurs besoins physiologiques et bien-être (motricité, postures, réactions aux stimuli lors de la manipulation).

15950 Depuis plusieurs années, l'intérêt s'est porté sur les propriétés régulatrices des acides aminés. Plus particulièrement, différents travaux ont montré que la citrulline, un acide aminé n'entrant pas dans la production des protéines, était un puissant activateur de la production des protéines musculaires. De telles propriétés pourraient être mises à profit dans la prise en charge de pathologies atteignant la fonction musculaire. De plus, la citrulline thérapeutique préserve la fonction cardiovasculaire, en particulier via un effet vasculaire (vasodilatateur). En parallèle, une étude réalisée chez des rats âgés dénutris et confirmée chez l'Homme sain soumis à un régime hypoprotéique, a montré que la citrulline était capable de stimuler la synthèse protéique musculaire et d'augmenter le contenu protéique musculaire.

Ce projet étudiera les effets de la citrulline plasmatique produite par une enzyme intestinale appelée OTC en cas de faible apport protéique. En particulier, nous nous intéresserons aux effets de la citrulline endogène sur la fonction cardiovasculaire, la susceptibilité aux infarctus ainsi qu'au métabolisme énergétique myocardique sous un régime hypoprotéique.

De ce fait, nous avons choisi de travailler sur une lignée de souris génétiquement modifiée nous permettant d'inactiver spécifiquement la production intestinale de citrulline et d'en évaluer les conséquences sur la fonction cardiovasculaire ainsi que sur le métabolisme énergétique.

Dans un premier temps, nous évaluerons les fonctions cardiovasculaires et de métabolisme énergétique des souris sans la production de citrulline intestinale sous un régime alimentaire hypoprotéique.

Puis nous induirons un infarctus à une partie de ces souris et nous étudierons l'importance de l'état nutritionnel et de citrulline intestinale sur la récupération des souris.

Le protocole a été établi pour satisfaire au mieux la règle des 3R

Remplacer L'objectif étant de mieux comprendre le rôle de la citrulline endogène dans les fonctions cardiovasculaires en général et dans des modèles de maladies cardiovasculaires en cas de faible apport protéique, une étude *in vivo* est indispensable. Le modèle murin a été choisi pour cette étude car il est le seul connu permettant d'obtenir les modifications génétiques nécessaires à notre étude.

Raffiner L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long des procédures afin d'intervenir de manière rapide et appropriée au moindre signe clinique de douleur. De même, des points limites seront établis afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus.

Réduire Au vu d'études préliminaires et dans le but d'obtenir une puissance statistique suffisante nous permettant de répondre de manière pertinente aux questions posées par l'étude, un minimum de 12 individus par sexe et par groupe a été établi. Ainsi, un total de 144 animaux pour l'ensemble des procédures (72 souris pour un suivi du système cardiovasculaire/métabolique/protéino-énergétique et 72 souris qui vont subir une ischémie/reperfusion).

15951 Le corps humain possède une barrière naturelle tapissant les vaisseaux sanguins du cerveau et qui permet d'empêcher le passage d'agents étrangers ou des toxines depuis le sang vers le tissu cérébral. Bien qu'indispensable, cette barrière devient un obstacle lorsqu'il s'agit de délivrer des traitements au cerveau car dans la grande majorité des cas ceux-ci ne peuvent pas la traverser. Dans le cas des thérapies géniques qui visent à remplacer ou à corriger un gène défectueux, les particules virales utilisées pour apporter le gène correcteur ne peuvent pas traverser cette barrière lorsqu'elles sont administrées par voie sanguine et elles ne peuvent donc pas corriger le problème génétique dans le cerveau. Par conséquent, cette barrière est un frein pour le développement de traitements des maladies génétiques affectant de plus grandes régions voire l'ensemble du cerveau.

La recherche de méthodes permettant le passage d'agents thérapeutiques à travers cette barrière constitue donc un challenge majeur et en ce sens de nouvelles stratégies sont actuellement développées. L'une d'elle, les ultrasons focalisés, consiste à augmenter temporairement la perméabilité de cette barrière afin de permettre à l'agent thérapeutique injecté dans la circulation sanguine de pénétrer dans le cerveau. Cette augmentation de perméabilité est totalement réversible et ne provoque pas de dommages au tissu cérébral. Cette nouvelle technique a donc un fort potentiel thérapeutique que nous souhaitons exploiter dans le cadre de maladies génétiques. Cependant, avant de développer ces applications thérapeutiques, il convient de reproduire et d'adapter les paramètres expérimentaux à notre propre équipement afin d'obtenir les résultats décrits par d'autres équipes.

L'objectif de ce projet est de tester la faisabilité de la technique des ultrasons focalisés qui permet d'augmenter de façon transitoire et réversible la perméabilité de cette barrière. Nous souhaitons tester la faisabilité de cette méthode chez la souris avec l'équipement disponible à notre institut afin de pouvoir l'utiliser par la suite pour des études à visée thérapeutique.

Ce projet est composé de trois procédures expérimentales et requerra l'utilisation d'un maximum de 160 souris.

Réduction : Ce nombre d'animaux a été déterminé afin d'obtenir des résultats standardisés et reproductibles en réduisant au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en en gardant suffisamment pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées.

Raffinement : Les procédures seront effectuées sous anesthésie générale avec une prise en charge antalgique adéquate. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à des signes cliniques codifiant le niveau de bien-être. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée si des signes de souffrance apparaissent.

Remplacement : Ce projet a pour but de tester la faisabilité de la technique des ultrasons focalisés sur la souris. De ce fait, il est impossible de remplacer notre approche *in vivo* par un modèle cellulaire ou une simulation informatique.

15952 Les maladies cardio-métaboliques, qui incluent les maladies cardiaques et le diabète, représentent la cause principale de mortalité. La thérapie courante consiste principalement à diminuer les apports lipidiques, mais de nouvelles stratégies ciblent la composante inflammatoire. Les macrophages sont des cellules immunitaires qui jouent un rôle clé dans le diabète et les maladies cardiaques en stimulant l'inflammation. Les macrophages sont présents dans les tissus impliqués dans le diabète et les maladies cardiaques tels que le cœur, l'aorte, le pancréas et le foie. Ces cellules connues pour éliminer efficacement les pathogènes jouent également un rôle essentiel dans le

développement et le maintien de l'homéostasie des tissus. Il est donc primordial de comprendre comment leur maintien est assuré et contrôlé, à la fois dans des animaux sains ou malades. Pour ce faire, nous allons utiliser une combinaison de modèles murins sophistiqués et des techniques d'imagerie avancées permettant la distinction et la visualisation des différentes populations de macrophages ex-vivo dans les tissus prélevés de souris saines ou malades (obésité et maladies cardiovasculaires).

Notre projet nécessite l'utilisation d'animaux car les approches que nous pourrions développer *in vitro* ne permettent pas de récapituler la complexité des interactions cellulaires que nous nous proposons d'étudier. Le plan expérimental de notre projet, affiné par une étude statistique du nombre d'animaux nécessaires à l'obtention de résultats fiables, a été conçu pour respecter la règle des 3 R (Réduire, Raffiner, Remplacer). Les souris sont élevées en groupes sociaux dans des environnements complexes afin de satisfaire leur instinct grégaire, de favoriser les comportements naturels et de limiter l'agressivité. Ainsi, les cages contiennent plusieurs souris et un dôme dans lequel elles peuvent créer leur nid et s'y reposer. Les cages sont contrôlées quotidiennement par 2 animaliers qui vérifient l'état sanitaire et le bien-être des animaux. Ce suivi journalier à l'aide d'une grille de scores permettra une action rapide en cas de douleurs ou d'atteinte des points limites établis (Annexe 1). Pour obtenir les résultats attendus nous prévoyons d'utiliser 324 souris sur une période de 2 ans.

15953 Les populations de saumon Atlantique et de truites de mer (Salmonidés) ont chuté de 70% depuis les années 1970. Différentes mesures de gestion peuvent être prises pour restaurer les populations, parmi lesquelles la reconnexion des habitats essentiels à l'accomplissement du cycle de vie. La France abrite des populations de truite de mer et surtout de saumon qui localement ont une très forte valeur patrimoniale. Ces espèces sont en effet emblématiques de nombreux fleuves. Les autres espèces de poissons migrateurs sont également menacées, comme les aloses (*Alosa alosa* et *Alosa fallax*) par exemple.

Le Ministre de la Transition Ecologique et Solidaire a, il y a quelques semaines, annoncé le démantèlement de barrages qui bloquent la colonisation de petits fleuves côtiers. Un des grands arguments en faveur de ces démantèlements est justement la reconquête de la continuité écologique. L'hypothèse d'une recolonisation de ces zones a été un élément fort pour motiver l'arasement étant donnée la problématique de conservation des populations de salmonidés. Ainsi, analyser, à différentes échelles spatiales et temporelles, les déplacements individuels et l'utilisation de l'habitat des poissons migrateurs dans les petits fleuves côtiers après l'arasement est une étape incontournable de l'évaluation de l'effet des mesures de gestion, très fortement attendue par les gestionnaires et les riverains.

Dans ce but, le comportement des saumons, truites de mer et aloses pendant leur migration estuarienne et fluviale sera étudié par télémétrie (radiopistage). Le signal émis par émetteur implanté dans les poissons est réceptionné lors du passage à proximité des stations d'écoute disposées stratégiquement sur leur route migratoire dans les fleuves, permettant ainsi d'analyser les déplacements des poissons.

En 2019-2020, 80 poissons du genre *Salmo*, et 20 poissons du genre *Alosa* seront ainsi marqués et suivis. Il est attendu que la grande majorité des poissons capturés seront des saumons atlantiques, néanmoins, des truites de mer pourraient également être marquées.

Remplacement l'objectif étant l'apport de connaissances sur les comportements migratoires et l'utilisation de l'habitat de ces deux espèces en milieu naturel, le remplacement est impossible.

Réduction le nombre d'adultes du genre *Salmo* (80) a été défini pour acquérir suffisamment de données pour fournir une image de la diversité des comportements. En ce qui concerne les aloses, le chiffre de 20 est jugé suffisant pour des tests de faisabilité en 2020.

Raffinement les poissons capturés seront anesthésiés avant toute manipulation avec une solution de benzocaïne (concentration de 40 mg/L), puis seront surveillés par une personne compétente pendant leur récupération avant remise à l'eau quelques minutes plus tard.

15954 L'obésité est un problème majeur de santé publique à l'échelle mondiale. Actuellement, plus de 300 millions de personnes sont obèses et ce nombre ne cesse de s'accroître. Ces patients ont un risque accru de développer des pathologies chroniques telles que le diabète de type 2, des maladies cardiovasculaires et plusieurs types de cancers. Soigner l'obésité permettrait ainsi de réduire de manière significative l'incidence de toutes ces maladies associées. Malheureusement, les traitements existants à l'heure actuelle sont peu efficaces et les régimes hypocaloriques ne conduisent qu'à une perte de poids temporaire, suivie très fréquemment par un retour rapide au poids initial dès la fin du régime (phénomène dit de « yo-yo »). Seule une intervention chirurgicale associant une réduction de la taille de l'estomac et une déviation de l'intestin est à ce jour efficace à long terme pour traiter l'obésité. Cependant, les risques et effets secondaires liés à cette chirurgie en font un choix de dernier recours réservé aux cas d'obésité les plus graves. Nous manquons ainsi d'options pharmacologiques qui permettraient une prise en charge efficace de la majorité des patients obèses tout en limitant les contraintes et effets secondaires.

Des études ont montré que l'obésité et le syndrome métabolique peuvent être associés à des changements microbiologiques profonds, et que la composition du régime alimentaire et son apport calorique peuvent réguler rapidement la composition et la fonction microbienne intestinale. Il a par ailleurs été montré que l'induction d'un phénotype de type syndrome métabolique pouvait être obtenu après transplantations fécales. Ces résultats démontrent l'importance du microbiote dans cette maladie.

Nous nous proposons de tester une souche bactérienne sélectionnée pour ses bienfaits sur la santé, et de regarder sa capacité à potentialiser la perte de poids suite à une restriction calorique, approche nutritionnelle classique, qui est proposée aux patients afin de réduire le poids corporel. Pour cela, nous étudierons l'effet de cette souche chez des souris qui auront été préalablement rendues obèses avec un régime dont 60% des calories sont apportées par les lipides. La réduction de l'apport calorique sera obtenue en réduisant la proportion des lipides dans le régime.

Nous utiliserons au total un maximum de 96 C57BL/6N souris adultes sur 2 ans. La souris représente un modèle de choix pour notre projet, en effet la physiologie générale est suffisamment proche de celle de l'être humain pour que les informations obtenues soient pertinentes d'un point de vue médical. De plus, les mécanismes biologiques que nous étudions impliquent une communication bidirectionnelle entre le cerveau et le reste de l'organisme, que ce soit pour la régulation de l'appétit ou du métabolisme. Ainsi, il est absolument nécessaire d'étudier un organisme entier et aucune méthode *in vitro* ou *in silico* ne peut le remplacer. En respect du principe de 3Rs, nous avons néanmoins optimisé les protocoles afin de réduire au maximum le nombre de souris utilisées des tests de puissance statistique ont été employés pour calculer le plus petit nombre d'animaux par groupe nécessaire à l'obtention de résultats statistiquement exploitables. Ce nombre tient aussi compte du fait que les expériences seront réalisées deux fois de manière indépendante afin de s'assurer de la reproductibilité des résultats. Enfin, en vue du raffinement des procédures, un soin particulier est apporté aux questions relatives au bien-être animal en garantissant un enrichissement de l'environnement et une habitude aux expérimentateurs afin de réduire tout stress.

15955 Les laboratoires de recherche privés ou académiques comptent dans leurs rangs de nombreux techniciens qui interviennent directement dans la mise en œuvre de projets scientifiques utilisant des animaux vivants. Ces projets ont pour but d'améliorer à la fois nos connaissances mais aussi la santé humaine ou animale. Le DUT Génie biologique option analyses biologiques et biochimiques sanctionne la formation universitaire de techniciens supérieurs qui sont recrutés par les laboratoires.

L'objectif de ce projet est d'assurer les compétences des agents recrutés et de former au mieux les étudiants de première année sur la base de travaux pratiques (TP) chez le rat et la souris. Les TP seront réalisés sur l'animal anesthésié avec mise à mort avant réveil chez le rat ou sur souris vigile. Les étudiants seront formés à l'anatomie des systèmes, à la physiologie des fonctions mais aussi à l'analyse comportementale, en passant par l'apprentissage des techniques élémentaires d'administration, de prélèvement, de chirurgie. Le degré de gravité des procédures appliqué est soit

sans réveil soit léger. Le nombre d'animaux pour mener à bien ces objectifs est estimé à 2695 sur 5 ans.

Du fait des requis pour la formation de techniciens, aucune méthode alternative (non-animale *in vivo*) n'est ici adaptée. Sur la base de l'expérience des années passées et en conformité avec la règle des 3R, le nombre des TP réalisés ainsi que le nombre d'animaux par TP sont limités à la quantité minimale suffisante pour atteindre les objectifs.

En résumé, par an et sachant qu'il y a 7 groupes de 14 étudiants, les TP nécessitent 441 rats 49 animaux /TP (pour 5 TP avec 1 rat /2 étudiants) et 98 rats/TP (pour 2 TP avec 1 rat/étudiant) et 98 souris (1TP avec 1 souris / étudiant).

Les espèces choisies sont celles qui sont les plus utilisées dans les travaux de recherche fondamentale ou appliquée. Tous nos animaux sont mis à mort par prolongation surdosée de l'administration systémique d'un anesthésique général ou par inhalation de CO₂. Afin de réduire les contraintes et assurer le bien-être des animaux, les procédures appliquées sont réalisées soit sous anesthésie sans réveil, ou sont de nature légère en limitant la durée et l'intensité des stimulations de nature à engendrer du stress ou de la douleur. De même, les animaux sont habitués au préalable pour chaque TP à l'environnement des TP (salle et expérimentateur) de manière à diminuer le stress et faciliter les manipulations pour les rendre aussi les moins stressantes pour l'animal. Notre expérience passée montre que les animaux ne présentent pas de troubles de leur bien-être (prise de poids, contact sociaux, déplacement et postures normales etc). Malgré tout si de tels troubles des comportements évalués apparaissaient, l'euthanasie de l'animal (inhalation CO₂ ou overdose anesthésique) serait pratiquée.

15956 Ce projet a pour objectif de tester un traitement pharmacologique pour la maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 4H (CMT4H), maladie génétique neuromusculaire actuellement incurable, qui atteint la myéline du Système Nerveux Périphérique (SNP). Elle se manifeste, chez l'Homme, par une fonte musculaire au niveau des membres inférieurs, causant, entre autres, des troubles de la marche, des douleurs, et des déformations des pieds. C'est une maladie invalidante, qui progresse tout au long de la vie, mais qui met rarement en jeu le pronostic vital.

En 2007, il a été démontré que des mutations dans le gène FGD4 sont la cause de cette maladie génétique. En vue de comprendre le rôle de FRABIN, la protéine qui est produite à partir du gène FGD4, dans les nerfs périphériques, et de développer un traitement chez l'homme, nous avons mis au point des modèles murins de la maladie.

Les modèles murins que nous utilisons dans ce projet sont des modèles dits « knock-out », dans lesquels nous avons réalisé une modification génétique afin d'empêcher totalement l'expression du gène *fgd4*, soit i) uniquement dans la myéline, gaine protectrice des nerfs du SNP (modèle conditionnel), ou ii) dans tous les tissus du corps (modèle complet). Nous avons caractérisé ces modèles et les avons étudiés sur une période de 24 mois, à l'aide de tests de comportement classiquement utilisés pour étudier la locomotion et la douleur. Nos résultats montrent, que, si les souris ne semblent pas montrer de défauts majeurs au niveau du comportement, elles ont bien les mêmes anomalies de la myéline dans leurs nerfs périphériques que l'Homme, qui évoluent avec l'âge. L'absence de phénotype majeur au niveau de la locomotion est classique dans les modèles murins de la maladie de Charcot-Marie-Tooth et est due au fait que cette maladie est dite 'longueur dépendante', c'est-à-dire que les nerfs dégénèrent à partir de leur extrémité la plus distale. Ainsi, la longueur des nerfs des souris étant très largement inférieure à celle des nerfs humains (plus d'un mètre pour le nerf sciatique par exemple), les effets d'anomalies dans le nerf sont beaucoup moins visibles chez des animaux ayant des membres courts comme la souris. Dans notre modèle, le phénotype étudié est visible au niveau des nerfs (anomalies de la myéline observables par des analyses histo-pathologiques) sans effet significatif au niveau de la locomotion. L'efficacité du traitement que nous voulons tester sera évaluée par son effet sur la diminution des anomalies de la myéline au niveau des nerfs périphériques.

La molécule que nous souhaitons tester s'appelle la niacine ou vitamine B3, et nous l'avons choisie, parce-que nous avons démontré, dans un modèle de myéline en culture dérivé de notre modèle

murin, que la niacine était capable de diminuer de façon drastique les anomalies de la myéline caractéristiques de la maladie CMT4H. Les essais *in vivo*, dans nos modèles murins sont la prochaine étape obligatoire dans les démarches réglementaires en vue de la mise en place d'un essai clinique chez l'homme.

Nous utiliserons 260 souris sur 5 ans, dans 2 procédures :

- le traitement par voie intrapéritonéale, en vue de vérifier l'efficacité de la molécule *in vivo*,
- le traitement par voie orale, plus proche du mode d'administration qui sera utilisé chez l'homme, en cas d'essai clinique.

Cette étude sera réalisée dans un établissement utilisateur agréé et les souris seront manipulées et suivies par du personnel compétent. Les animaux feront l'objet d'une surveillance quotidienne afin de détecter précocement les points limites de souffrance et de stress. Comme évoqué plus haut, nos souris, sur le plan du comportement, ne présentent pas de différences avec les souris sauvages, ce qui limite le risque de souffrance et de stress. Les dommages dus à l'absence du gène *fgd4*, se manifestent au niveau des nerfs périphériques, sans conséquences phénotypiques importantes. Nous appliquerons néanmoins la règle des 3R :

- Remplacer notre projet se fera dans la continuité d'une étude *in vitro*. Le passage au modèle *in vivo* est une étape indispensable avant d'envisager un essai thérapeutique chez l'homme.
- Réduire Le nombre d'animaux a été limité au minimum nécessaire pour mettre en évidence un effet significatif sur le nombre d'anomalies de la myéline.
- Raffiner afin d'améliorer le bien-être animal au cours de notre étude, les besoins physiologiques des animaux seront respectés (nourriture et eau à volonté, cages propres, enrichissement, stabulation en groupe). Des points limites clairs ont été définis et les animaux seront mis à mort lorsqu'ils atteindront les critères d'interruption.

15957 Le diabète de type 1, aussi appelé diabète sucré, est une maladie auto-immunitaire caractérisée par une forte concentration de glucose dans le sang. En effet, cette pathologie résulte en une importante perte des cellules bêta-pancréatiques qui sont les seules cellules de l'organisme pouvant produire de l'insuline, hormone permettant aux cellules d'utiliser le glucose. L'une des conséquences les plus dramatiques de cette pathologie est le développement de néphropathie, autrement dit de complications rénales pouvant nécessiter des dialyses ou une transplantation. Le diabète est d'ailleurs la cause principale de pertes de fonctions rénales chez l'homme. Actuellement, les traitements pour le diabète de type 1 associent généralement un changement dans le régime alimentaire et des injections d'insuline afin de réguler le glucose sanguin. Cette approche peut être inconfortable pour les patients et nous nous proposons d'explorer une autre piste. Plusieurs travaux récents semblent indiquer qu'il est possible de protéger ou de régénérer les cellules produisant de l'insuline en modulant différentes propriétés de ces cellules. Parmi ces cibles potentielles, les récepteurs aux cannabinoïdes-1 (CB1R) système endocannabinoïde (SEC) et la protéine kinase activée par l'adénosine 5'-monophosphate (AMPK) ont retenu notre attention.

Notre intérêt d'étudier les CB1R fait suite aux études montrant qu'une activation de ces récepteurs au niveau pancréatique conduit à une destruction ou une perte de fonction des cellules responsables de la production d'insuline, favorisant ainsi le développement du diabète. Inversement son blocage avec un agent pharmacologique semble partiellement corriger ces effets.

L'AMPK quant à elle apparaît comme l'un des médiateurs clés dans l'efficacité de nombreux agents antidiabétiques et son activation semble indispensable à l'amélioration des contrôles glycémiques.

Ainsi, notre objectif consiste à déterminer si le blocage des CB1R et l'activation simultanée de l'AMPK pourrait être une stratégie thérapeutique efficace pour lutter contre le diabète de type 1. Pour cela, nous disposons d'un agent pharmacologique hybride présentant la double capacité de bloquer les CB1R et de stimuler l'activité de l'AMPK. Nous souhaitons donc tester cette molécule sur la prévention et le développement du diabète de type 1 et de ses conséquences sur les fonctions rénales.

L'utilisation du modèle animal (souris) s'impose dans ce projet d'une part du fait de l'absence d'outils pharmacologiques validés par l'agence européenne des médicaments (EMA) qui auraient pu permettre la mise en place d'une étude clinique et d'autre part par le besoin d'analyser les mécanismes fondamentaux impliqués dans cette pathologie multifactorielle. De plus, Il n'est pas possible d'étudier tous ces aspects et mécanismes impliquant des échanges entre les organes en se limitant à des approches *in vitro*.

Ainsi, nous utiliserons 320 souris NOD/ShiLtJ femelles adultes. Ces souris représentent le modèle de référence pour l'étude du diabète de type 1 auto-immun. De façon similaire à ce qui est observé chez l'Homme, ces animaux développent spontanément un diabète caractérisé par une hyperglycémie ainsi qu'une inflammation des zones du pancréas produisant l'insuline. Nous utiliserons des souris femelles, car il est connu que très peu de souris NOD mâles développent la pathologie. En moyenne, 50% des souris femelles développent un diabète à l'âge de 18 semaines et la littérature indique qu'un nombre de 20 souris par lot est requis pour atteindre une significativité de différence dans les résultats avec ce modèle. Nous avons donc besoin d'intégrer 40 souris par lot au départ afin de prendre en compte cette variabilité. Nous souhaitons mettre en place 2 procédures comprenant 2 lots de souris chacune (Les animaux seront alors divisés en 2 groupes, le premier sera traité quotidiennement par gavage avec la molécule test et le 2ème groupe recevra un placebo dans les mêmes conditions) qui seront répétés 2 fois. Cela se traduit donc par (40 souris/lot * 2) * 2 répétitions) 160 souris par procédure et donc un total de 320 souris pour ce projet.

. Nous utiliserons des souris femelles, car il est connu que très peu de souris NOD mâles développent la pathologie. Afin de respecter la règle des 3 R, plusieurs mesures seront mises en place. Le diabète de type 1 pouvant conduire à un risque accru de déshydratation et d'hypothermie, nous opérerons un suivi quotidien des animaux afin de détecter tout dommage imprévu et ainsi intervenir pour soulager/abrèger toute souffrance. Enfin, le nombre d'animaux utilisé a été réduit au minimum requis pour obtenir des résultats statistiquement interprétables et atteindre l'objectif scientifique du projet. Nous avons également limité au maximum l'utilisation d'animaux pour les études mécanistiques en complétant cette approche par l'utilisation d'une approche *in vitro* sur différentes lignées cellulaires de cellules bêta pancréatiques ou de cellules rénales. En outre, le jour de chaque expérimentation, les souris seront manipulées par des expérimentateurs titulaires du niveau B.

D'autre part, bien que notre intérêt principal concerne les fonctions pancréatiques et rénales, nous nous efforcerons de collecter tous les autres tissus potentiellement impactés par l'élévation chronique du glucose sanguin comme le cerveau, les muscles, le foie ou encore les différents tissus adipeux. Cela nous permettra de mettre en place une banque d'organes et ainsi de mutualiser les échantillons afin de réduire le nombre d'animaux nécessaire pour de futurs projets ou des projets collaboratifs.

Nous espérons que ces travaux permettront de mieux comprendre les interactions entre les CB1R et l'AMPK dans les perturbations métaboliques associées au diabète de type 1. Nous pensons que ce projet pourrait conduire à l'élaboration de futures stratégies thérapeutiques pour le traitement de cette pathologie.

15958 Les tiques du genre *Ixodes* sont susceptibles de transmettre différents pathogènes, le plus connu étant la bactérie responsable de la borréliose de Lyme. Utilisant le modèle murin de cette maladie, nous avons mis en évidence que les bactéries, même après dissémination vers le système nerveux, les articulations et la peau à distance du point de piqûre, se multiplient dans la peau au point de piqûre vers 7 jours et y persistent plusieurs mois en absence de traitement antibiotique.

Utilisant une nouvelle technique de protéomique, nous avons identifié dans la peau de souris des protéines bactériennes de la maladie de Lyme. Nous avons ensuite sélectionné 5 protéines de la bactérie et nous avons été rechercher par cette nouvelle technique, ces protéines de bactéries dans des peaux de patients présentant une maladie de Lyme. La bactérie a été mise en évidence chez ces patients. Nous sommes en train de valider cette nouvelle méthode chez un plus grand nombre de patients.

Les tiques pouvant inoculer d'autres pathogènes à l'homme, nous voudrions développer un diagnostic universel sur biopsies de peaux humaines pour rechercher les autres agents infectieux susceptibles d'avoir été transmis par des tiques infectées collectées dans la nature : 10 à 20 % des tiques sont infectées dans la nature. Nous collecterons des tiques sauvages que nous mettrons à gorgier selon notre protocole habituel de gorgement de tiques sur souris. Ce nouveau diagnostic devrait faciliter le diagnostic des maladies à tiques chez les personnes piquées par des tiques potentiellement infectées.

Ce projet sera mené en conformité avec le principe des 3R

Remplacement Nous travaillerons sur la peau de la souris piquée par les tiques sauvages afin de rechercher des protéines spécifiques des divers pathogènes et pour cela nous avons besoin que nos souris s'infectent c'est pour cela que nous avons besoin de travailler sur le modèle animal entier. On ne peut pas faire piquer des tiques infectées sur une peau artificielle car les tiques doivent rester en place 3 jours puis la souris est maintenue en vie 7 jours pour laisser multiplier les pathogènes et faciliter ainsi leur détection.

Raffinement : une attention particulière sera portée aux animaux piqués par les tiques sauvages afin de limiter leur inconfort. Les animaux sont hébergés seuls par cage mais à proximité olfactive et visuelle de leurs congénères. Ils sont nourris ad libitum.

Réduction Dans notre étude vu le petit nombre de tiques infectées il nous faudra un nombre suffisant de souris pour déposer sur elle des nymphes ou des adultes potentiellement infectées. Dans notre projet nous envisageons d'utiliser 100 souris C3H/HeN.

15959 L'émergence de bactéries résistantes à de multiples antibiotiques est un fait inquiétant en santé publique. Ces dix dernières années, le paysage de ces germes a changé, avec la dominance de l'espèce *Escherichia coli* (*E. coli*) parmi ces germes multi-résistants, et l'apparition d'une nouvelle classe enzymatique dite beta-lactamases à spectre étendu de type CTX-M. Ces bactéries multi-résistantes sont responsables d'une augmentation très nette des infections contractées en dehors de l'hôpital, dont des infections urinaires, et sont souvent responsables de septicémies.

E. coli est l'une des espèces bactériennes à Gram négatif prédominantes du microbiote intestinal. Elle colonise principalement le tractus digestif. Parmi les souches d'*E. coli*, il en existe certaines qui sont des agents pathogènes du fait des facteurs de virulence qu'elles expriment. Elles génèrent des infections intestinales mais aussi extra-intestinales telles que les infections du sang ou des voies urinaires.

Il est important de déterminer le rôle de ces facteurs de virulence dans les capacités d'expansion des *E. coli* multi-résistants.

Dans un souci de remplacement, des résultats obtenus *in vitro* ont déjà mis en évidence les effets de facteurs de virulence d'intérêt sur cellules en culture. Ce projet se propose de définir leur rôle *in vivo*. Pour cela, nous utiliserons des souches cliniques d'*E. coli* pathogènes pour l'homme, et ayant acquis une résistance à plusieurs antibiotiques, exprimant ou non un facteur de virulence étudié au laboratoire. Les souris seront infectées par voie orale. Elles auront au préalable reçu une dose orale de streptomycine, un antibiotique permettant de fragiliser la flore commensale du tractus digestif et de permettre une infection plus efficace par les souches à tester. Le suivi de cette infection sera effectué après 24h, 48h et 72h puis deux fois par semaine durant 14 jours par mesure de la présence des souches infectantes dans le tube digestif et les selles, ainsi que dans le foie, la rate, les ganglions mésentériques et le sang des animaux. Dans un souci de raffinement et de réduction des animaux requis, l'analyse de la littérature nous a permis de connaître la dose de bactéries maximale qui sera utilisée pour l'infection des souris par voie orale, évitant des expériences préliminaires visant à définir la dose infectieuse. Les données publiées nous permettent aussi de définir nos procédures comme légères car elles n'induiront a priori pas de douleur ni d'angoisse et seront sans incidence significative sur l'état général de l'animal pendant les temps courts ou longs de l'expérience. Cependant les animaux seront surveillés quotidiennement et toute apparition d'éventuels signes de douleur sera notée et un score de gravité permettra de déterminer le sort des animaux éventuellement affectés.

Les infections seront réalisées sur des souris C57BL/6 femelles de 8 semaines et de poids similaires qui auront été acclimatées à leur nouvel environnement pendant une semaine. L'ensemble du projet nécessitera un maximum de 420 souris et trois procédures. Dans un souci de réduction du nombre d'animaux, les tailles d'échantillons ainsi que les méthodes d'analyse de résultats ont été définies avec l'aide d'un biostatisticien. La variable primaire sur laquelle sera appliqué un test statistique est la numération bactérienne, mesurée par CFU. Les facteurs suivants sexe, provenance des animaux, expérimentateur, distribution des animaux par cage (important car prélèvement de fèces) sont pris en compte dans la planification de l'expérience afin de garantir que les groupes expérimentaux sont comparables. Ces sources de variabilité indésirables seront prises en compte lors de l'analyse statistique par l'utilisation de modèles adaptés du type ANOVA à effets mixtes. De plus, si nécessaire, des modèles plus complexes (ex modèles à effets mixtes, généralisés ou non) seront utilisés pour l'étude de la cinétique des phénotypes étudiés.

Une telle étude permettra d'identifier des facteurs critiques pour la persistance *in vivo* des E. coli multi-résistantes et pour la réduction du coût biologique que représente l'acquisition de multiples résistances par ces souches. Ces facteurs représenteront des pistes potentielles à cibler pour développer des approches thérapeutiques alternatives aux antibiotiques.

15960 Le succès de la transplantation hépatique comme traitement des maladies chroniques sévères du foie, a engendré une pénurie croissante d'organes disponibles. Alors que la majorité des greffons sont issus de donneurs par mort encéphalique à cœur battant, l'offre de greffons a été augmentée par l'utilisation de greffons issus de donneurs à cœur arrêté. Dans ce cas, les greffons sont soumis à une période courte d'ischémie chaude le temps que la mort soit déclarée après arrêt cardiaque chez le donneur. Ces greffons sont dits « marginaux » car ils sont plus susceptibles aux lésions d'ischémie-reperfusion induites par la conservation hypothermique et sont associés à un risque plus élevé de perte du greffon, voire de décès du patient après transplantation.

Dans ce contexte, un défi majeur consiste à optimiser la préservation de ces greffons marginaux avant la transplantation afin d'améliorer les résultats. Dans ce sens, des stratégies de perfusion dynamique utilisant des machines de perfusion ont été mises en place. Cependant, les solutions de conservation hypothermique actuellement disponibles n'ont pas été conçues pour protéger les greffons marginaux contre les lésions d'ischémie-reperfusion. De plus, à ce jour, aucune solution de conservation des greffons hépatiques n'a été validée à la fois pour la préservation statique et dynamique avec machine de perfusion.

Le but de ce projet est donc de tester et valider la nouvelle solution de conservation hypothermique IGL2 à la fois en situations statique et dynamique pour les greffons hépatiques marginaux dans le cadre de la transplantation hépatique.

Dans une première phase, nous étudierons l'impact de cette nouvelle solution de conservation IGL2 sur les lésions d'ischémie-reperfusion dans le contexte de préservation hypothermique statique des greffons marginaux (conservation du greffon dans une solution froide à 4°C depuis l'explantation chez le donneur jusqu'à l'implantation chez le receveur). Dans une seconde phase, nous appliquerons cette nouvelle solution de conservation IGL2 dans le cadre de la préservation hypothermique dynamique des greffons marginaux par machine de perfusion.

Objectif I Impact de la solution de conservation IGL2 sur les lésions d'ischémie-reperfusion après préservation hypothermique STATIQUE des greffons issus de donneurs à cœur arrêté (lésions hépatiques sévères avant préservation).

Objectif II Impact de la solution de conservation IGL2 sur les lésions d'ischémie-reperfusion après préservation hypothermique DYNAMIQUE des greffons issus de donneurs à cœur arrêté.

Le projet portera sur 48 porcs domestiques d'élevage répartis en 6 groupes expérimentaux.

Pour chaque type de préservation, la nouvelle solution de conservation IGL2 sera comparée à la solution de conservation statique de référence UW (Université de Wisconsin, Wisconsin, USA) et la solution de conservation dynamique de référence pour machine de perfusion Belzer MPS (Machine Perfusion Solution, Bridge-To-Life, Columbia, USA).

- Préservation STATIQUE des greffons marginaux avec IGL2 et avec UW.
- Préservation DYNAMIQUE des greffons marginaux avec IGL2 et avec Belzer MPS.
- Groupe CONTRÔLE Préservation STATIQUE des greffons « contrôles » avec IGL2 et avec UW.

Le groupe contrôle sera constitué de greffons hépatiques prélevés sans avoir subi au préalable de période d'ischémie chaude, comme cela est le cas pour les greffons issus de donneurs par mort encéphalique à cœur battant.

Résultats attendus

Nous nous attendons à montrer que la solution IGL2 est aussi efficace que les solutions de référence statiques et dynamiques pour la prévention des lésions d'ischémie-reperfusion des greffons marginaux issus de donneurs à cœur arrêté.

Le projet répond aux principes des 3Rs

- Réduction à la place d'une transplantation hépatique chez des porcs receveurs, nous avons fait le choix de remplacer cette étape par une reperfusion normothermique des greffons par machine de perfusion ex-vivo. Cette technique ne nécessite pas de receveurs. De ce fait, nous réduisons par 2 le nombre d'animaux utilisés.
- Remplacement l'étude des lésions d'ischémie-reperfusion des greffons hépatiques est complexe et nécessite des analyses séquentielles par biopsies tissulaires et analyses sanguines répétées pendant le prélèvement, la conservation et après la reperfusion des greffons. Ces analyses sont donc trop invasives pour être réalisées directement chez l'humain.
- Raffiner Le bien-être des animaux est respecté par une manipulation adaptée de sujets habitués à l'homme, et la réalisation d'une anesthésie profonde dans les règles de l'art durant tout le temps opératoire. Les animaux sont mis à mort sans risque de réveil dès la fin des actes chirurgicaux.

15961 L'hyperactivité vésicale (HV) est définie comme la présence d'une urgenturie avec ou sans incontinence urinaire, souvent associée à une pollakiurie diurne et à une nycturie. Sa prévalence est estimée entre 11 et 21% en Europe occidentale, elle augmente avec l'âge et a des répercussions importantes sur la qualité de vie. En effet, les patients rapportent des scores de qualité de vie significativement inférieurs, tant l'HV perturbe leurs activités quotidiennes, la qualité de leur sommeil, ainsi que leurs profils psychologique et sexuel. Ainsi, la prévalence élevée, les conséquences psychosociales et les coûts relatifs à la prise en charge médicale de ce syndrome en font un réel problème de santé publique.

Le bon fonctionnement du bas appareil urinaire impose l'intégrité du système nerveux central et périphérique, somatique et neurovégétatif. C'est à cette seule condition que la motricité vésico-sphinctérienne peut assurer l'alternance des phases de continence et de vidange, par des phénomènes d'activation/désactivation de fibres musculaires. En conditions physiologiques, les afférences vésicales neuronales (de types A δ et C majoritairement) empruntent les fibres myélinisées A δ , sensibles à la distension vésicale et à l'origine du réflexe mictionnel, tandis que les C restent silencieuses. A l'inverse, en conditions pathologiques, ces dernières sont hyperactivées à l'étirement vésical, déclenchant ainsi le réflexe mictionnel, alors que celui qui passait par les fibres A δ disparaît complètement. Ainsi, la contribution de l'hyperactivité des fibres afférentes vésicales notamment C dans l'émergence de l'HV fait l'objet d'une attention particulière.

Malgré les avancées médicales et chirurgicales, les traitements actuels pour cette pathologie sont limités. Les antimuscariniques sont le traitement de première intention avec cependant une efficacité limitée et des effets secondaires importants liés à leur manque de sélectivité pour la vessie, pouvant altérer l'observance du traitement. En deuxième intention, l'injection intradétrusorienne de toxine botulique A peut être proposée. Toutefois, son efficacité à long terme n'est pas connue et le caractère invasif de sa délivrance est certain. Il est donc nécessaire de conduire une recherche visant à la réalisation de tests précliniques sur un modèle animal fiable, pour permettre le développement de traitements pharmacologiques innovants, tout en optimisant leur efficacité et en limitant leurs effets secondaires.

Il n'existe à ce jour aucun modèle *in vitro* permettant l'étude de cette pathologie (remplacement) définie par des symptômes et donc difficile à appréhender hors d'une situation physiologique. Dans ce contexte, des modèles précliniques d'HV ont été développés, notamment des modèles aigus basés sur une irritation de la vessie par des agents chimiques visant à stimuler principalement les fibres afférentes vésicales de type C suite à l'instillation intra-vésicale de capsaïcine et de prostaglandine E2 (PGE2).

Les études pharmacologiques menées sur ces modèles conduiront à l'utilisation d'environ 960 rats femelles sur 5 ans. Le nombre d'animaux sera réduit au minimum nécessaire (réduction) pour réaliser des statistiques acceptables (12 rats par groupe de traitement), du fait des connaissances et de l'expérience du personnel participant au projet et des procédures liées. Les rates sont hébergées par 2 animaux, afin de favoriser leur interaction sociale et réduire leur stress et un enrichissement de la litière est mis en place de façon systématique (raffinement). Enfin, un suivi quotidien de l'état général et du poids des animaux est réalisé, pour une action rapide en cas de souffrance.

15962 Les trichlorométhylquinazolines sont une famille chimique, prometteuse en termes d'activité antipaludique, elles ont montré leur efficacité sur une souche originaire de Thaïlande chimiopolyrésistante. L'efficacité *in vitro* des trichlorométhylquinazolines et leur mécanisme d'action original sont des arguments prometteurs en termes de lutte contre le paludisme.

L'objectif du projet est d'estimer la capacité de protection de cette nouvelle famille chimique comptant plus de 200 dérivés. Cet essai est une preuve de concept afin de poursuivre ou non des essais avec ces composés. Il est réalisé avec les deux molécules récemment synthétisées et les plus prometteuses en termes d'évaluation *in vitro*.

De plus elles ont des doses éliminant la moitié des parasites proche de celles utilisés pour la quinine ou chloroquine qui sont deux molécules historiques.

Deux procédures expérimentales sont prévues afin de mener à bien ce projet, en prenant en compte la règle des 3R : Remplacer, Réduire, Raffiner

I) Amplification de la souche cryo-préservée de *Plasmodium berghei* ANKA

II) Preuve de concept 2 composés issus des trichlorométhylquinazolines seront testés en thérapeutique par rapport au traitement de référence de l'Organisation Mondiale de la Santé dans un modèle simple de paludisme murin

L'efficacité d'un médicament sur un agent infectieux nécessite par définition, un organisme vivant et entier. Cela est d'autant plus pertinent afin d'observer la protection conférée par le traitement vis-à-vis de cet agent infectieux dont les atteintes sont multi-viscérales. En accord avec le principe de réduction des effectifs, Le nombre de souris sera calculés par rapport aux lois statistiques de survie dans ce modèle. Les organes tissus seront prélevés après la mort afin de réaliser des études complémentaires. La récupération des échantillons biologiques permet également de limiter les expériences complémentaires ultérieures avec de nouveaux animaux vivants. Le remplacement par une méthode alternative n'est pas viable et les études *in vitro* ont déjà été menées au préalable avec des résultats concluants. Le choix du modèle murin BALB/cJ repose sur notre maîtrise complète du modèle, en tant que rongeur infecté ou non et des outils nécessaires à son évaluation. C'est un modèle largement utilisé en pharmacothérapie antipaludique. Le nombre de souris a été évalué à 17 femelles et 17 mâles matures pour l'expérience à raison de 4 souris par cage.

Quant aux dommages escomptés, les souris sont susceptibles de mourir en fonction de l'efficacité ou non du traitement.

En Afrique et à l'état sauvage, le parasite *Plasmodium berghei* infecte des petits rongeurs, grâce son vecteur local. En raison de sa capacité à infecter les rongeurs *P. berghei* est un organisme modèle populaire pour l'étude du paludisme humain.

En accord avec le principe de raffinement, les éventuels signes de souffrance seront recherchés et évalués. Les étapes demandant une immobilisation et sources d'anxiété seront réalisées sous anesthésie et analgésie Une attention particulière sera portée à l'enrichissement des rongeurs, de

manière à limiter l'anxiété des animaux. Des abris, des morceaux de cartons et des éléments à ronger seront placés dans les cages et les souris seront habituées à la manipulation.

15963 La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est la première maladie des motoneurones, des cellules chargées de porter « l'ordre » du mouvement depuis le cerveau vers les muscles. C'est une maladie aujourd'hui incurable qui touche en France 6000 patients avec une incidence de 3 nouveaux cas par jour. Elle est caractérisée par une paralysie progressive qui entraîne la mort du patient dans les 3 à 5 ans suivant le diagnostic. Dans 90% des cas, la cause de la maladie est inconnue, mais dans les 10% restant, des mutations ont été identifiées. En particulier une mutation dans le gène FUS provoque une forme particulièrement sévère de la maladie avec une apparition précoce des premiers symptômes et une progression rapide. Ce projet cherche à expliquer le phénomène de propagation de la dégénérescence des motoneurones dans la SLA en utilisant des souris modèles de la maladie portant la mutation FUS. Des études ont montré que la maladie implique non seulement les motoneurones mais également des cellules voisines de soutien des motoneurones dont le fonctionnement est altéré dans la SLA. Une protéine de ces cellules de soutien a été identifiée, qui favorise la sécrétion de protéines mutées caractéristiques de la SLA. La diffusion de ces protéines mutées depuis les cellules de soutien vers les motoneurones pourrait expliquer le processus de propagation de la dégénérescence. Dans ce projet, nous allons étudier l'implication de cette protéine dans le processus pathologique la SLA. Pour cela nous proposons de caractériser la localisation, l'abondance et l'expression de cette nouvelle protéine aux stades présymptomatiques et symptomatiques de la maladie. Nous espérons ainsi mettre en évidence un nouveau mécanisme de propagation de la dégénérescence des motoneurones dans la SLA et potentiellement identifier une nouvelle cible thérapeutique pour stopper ou ralentir cette dégénérescence.

Afin de respecter la règle des 3R, nous avons d'abord procédé à des études préliminaires sur des cultures *in vitro* pour remplacer au maximum l'utilisation d'animaux vivants. Ces résultats ont montré l'implication de notre protéine d'intérêt dans la sécrétion de protéines mutées, mais la complexité de la maladie, l'implication de différents types cellulaires et le besoin de corréliser nos observations à l'apparition des symptômes exigent de travailler sur un modèle vivant.

Afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés, nous avons déterminé le nombre minimal nécessaire permettant d'obtenir des résultats significatifs, en prenant en compte la variabilité interindividuelle des animaux et les tests statistiques qui seront utilisés lors de l'analyse des résultats dans ce projet nous utiliserons donc au maximum 96 souris.

Afin d'assurer leur bien-être, les animaux auront accès ad libitum à l'eau et à la nourriture et bénéficieront de conditions d'hébergement conformes à la réglementation en vigueur. L'enrichissement de l'environnement des animaux (bâtonnets à ronger, coton compressé pour faire des nids, maisons en plastique rouge), le maintien des interactions sociales et la surveillance quotidienne des animaux permettront de s'assurer de leurs bien-être et de détecter rapidement tout changement de comportement associé ou non à la pathologie étudiée afin qu'ils puissent être pris en charge. Des points limites permettant de soustraire l'animal à la souffrance ont été établis.

15964 Le diabète de type 2 est une pathologie métabolique associée à des complications à long terme qui touche près de 3,5 millions de personnes en France. A ce jour, aucun traitement thérapeutique retardant l'apparition ou la progression de la maladie n'est disponible.

Le diabète de type 1 peut être traité par l'insulinothérapie, et dans les cas les plus sévères par transplantation d'îlots pancréatiques, requérant néanmoins un traitement immunosuppresseurs (base de sirolimus).

Des études ont montré la capacité des cellules du pancréas à s'adapter et se multiplier. Un modèle de souris humanisées existe. Ces souris sont greffées avec des îlots humains, et permettent leur étude au long cours. C'est en utilisant ce modèle, qu'une équipe a montré l'adaptation des îlots humains à un environnement obésogène (induit par la nourriture hyperlipidique). Nous voudrions utiliser ce modèle pour éclaircir ce processus d'adaptation et d'identifier précisément le phénomène

afin de pouvoir le reproduire *in vitro*; Nous voudrions connaître l'effet des immunosuppresseurs sur les cellules (sirolimus).

Pour cette expérience, 625 souris seront utilisées (610 souris immunodéficientes, et 15 souris C57).

Afin de respecter la règle des "3R", Réduire : Nous réduisons au maximum le nombre de souris utilisées.

Remplacer : Pas de technique *in vitro* permettant de travailler sur les cellules au long cours. Raffiner : Les animaux seront hébergés et traités avec soin (nourriture et eau en illimité, visite quotidienne, cycle jour/nuit régulier), avec anesthésie et traitement de la douleur lors de la chirurgie. De plus, cette chirurgie est réalisée par du personnel formé et sensible aux règles d'éthique expérimentale.

15965 L'alimentation des poules pondeuses doit répondre à leurs besoins d'entretien et de production des œufs. Les besoins des poules pondeuses diffèrent en fonction des souches de poules et de leur âge. Il est également possible de formuler des aliments avec de nouveaux additifs (enzymes, pigments ou vitamines par exemple) ou des matières premières jusque-là peu utilisées. Dans ce contexte, l'objectif de ce projet est d'évaluer les besoins nutritionnels des poules pondeuses, ainsi que d'étudier l'intérêt de nouveaux additifs ou matières premières pour leur alimentation.

Ce projet, d'une durée de 5 ans, emploiera un nombre maximal de 2000 poules réparties sur 2 bandes/an (soit 200 poules/bandes). Les poules sont logées, en intérieur, par 2 dans des cages de 50x30cm (soit 750cm²/poule), et sont nourries en quantité nutritive ou en quantité sub-limitante (quantité aliment distribuée <à 80% du standard ou aliment appauvri en nutriments). Ces conditions d'hébergement correspondent à la réglementation pour les élevages <350 poules (directive 98/58/CE).

Les performances de ponte (taux de ponte, poids des œufs) et la consommation d'aliments sont enregistrées chaque semaine. Le poids des poules et la consommation d'eau sont également évalués régulièrement en fonction des thématiques d'essai. Les paramètres sanguins (glycémie, facteur d'inflammation, etc.) peuvent également être analysés sur maximum 50 animaux par bande lorsque les thématiques d'essais le nécessitent. Les prises de sang sont réalisées au niveau de la veine alaire (ou une méthode alternative), et sont limitées à 3 prises de sang de 4mL par animal et par essai (début, milieu, fin). Les prises de sang sont espacées de 2 semaines par animal et une poule fait 4 essais maximum (maximum 12 prises de sang / poule entre 14 et 100 semaines).

Ces essais sur les animaux sont nécessaires, car avant de généraliser un régime alimentaire sur un grand nombre d'élevages, il est nécessaire d'évaluer précisément son impact sur la santé et les performances des poules.

Les différents paramètres étudiés (performance de ponte, poids des poules, paramètres sanguins) sont analysés à l'aide d'ANOVA.

Les expérimentations sont conçues en respectant la règle des 3Rs :

-Remplacer Actuellement les modèles *in vitro* et tissulaires ne sont pas suffisants pour appréhender les variations inter-individuelles, l'effet des souches ou encore de l'environnement.

-Réduire Par essai, 4 à 5 aliments sont comparés (établi en fonction de la thématique). Ce dispositif permet d'observer des différences statistiques entre les aliments testés avec un minimum d'animaux (ppds de 5%)

-Raffiner Les animaux sont élevés dans des conditions proches de l'élevage avec en plus une attention particulière du suivi des animaux (passage d'animalier minimum 2 fois/jour) et contrôle de l'environnement. Les manipulations sont réduites au minimum afin de limiter le stress des animaux. De plus lors du prélèvement sanguin, 2 tentatives maximum sont autorisées

15966 L'hypertrophie bénigne de la prostate (HBP), désigne une augmentation de la taille de la prostate due à une prolifération excessive (appelée hyperplasie) des cellules de la zone transitionnelle (c'est-à-dire la région de la prostate qui entoure l'urètre). En clair, Il s'agit d'un gonflement bénin (non cancéreux) de la prostate causant une obstruction du passage de l'urine provenant de la vessie. Les manifestations cliniques sont très variables d'un individu à l'autre allant de l'absence totale de

signes cliniques, malgré un volume prostatique élevé, à une dégradation significative de la qualité de vie dues à des problèmes mictionnels liés à une obstruction vésicale tels que pollakiuries (augmentation de la fréquence mictionnelle pendant la journée), dysuries (difficulté à émettre les urines) voire des complications sévères comme l'insuffisance rénale ou la rétention urinaire aiguë complète.

Chez presque tous les hommes, la taille de la prostate aura augmenté à l'âge de 70 ans. En effet, il est estimé que cette affection touchera 70% des hommes de plus de 60 ans et 90% des plus de 70 ans.

L'HBP est une entité histologique caractérisée par une inflammation des cellules de la prostate liée au vieillissement ou par une augmentation du nombre de cellules prostatiques. Toutefois, il peut aussi arriver que des facteurs associés à l'alimentation et au mode de vie encouragent les réactions inflammatoires de l'organisme, accentuant la gravité des symptômes. Cependant, les mécanismes physiopathologiques de l'HBP restent encore mal connus. Aujourd'hui encore les traitements sont empiriques, avec pour but de soulager et diminuer l'intensité des symptômes et leur impact sur la qualité de vie des patients plutôt que d'agir sur la cause.

L'objectif de ce projet est de soumettre des rats mâles à un régime alimentaire enrichi en lipide (35 à 60% d'apport calorique sous forme de lipides) afin de développer une hypertrophie bénigne de la prostate et d'évaluer l'efficacité de nouvelles molécules thérapeutiques sur cette hypertrophie et/ou l'inflammation de la prostate (prélèvement de d'urine ou de sang ou cours du temps et de tissus à la fin de l'étude) induite par ce régime alimentaire ainsi que leurs potentiels effets sur la fonction vésicale (enregistrement du calendrier mictionnel par l'utilisation de cages métaboliques ou enregistrement du profil urodynamique). Nous utiliserons des rats étant donné que d'une part, les procédures d'évaluations (cages métaboliques, cystomanométrie éveillée ou anesthésiée) sont parfaitement maîtrisées au sein de l'équipe et d'autre part

L'HBP et les régimes enrichis en lipides (fat diet) sont décrits dans la littérature chez cette espèce. Actuellement, les méthodes alternatives permettant d'évaluer ces effets n'existent pas. Ainsi, le recours à l'expérimentation animale reste incontournable.

Dès leur arrivée dans la zone d'exploration fonctionnelle, les animaux seront hébergés dans les conditions définies par la directive européenne 2010/63/UE et un enrichissement adapté sera introduit dans l'hébergement des animaux afin de les stimuler (tel que des aspens bricks (morceaux de bois) ou des tunnels en polycarbonate). Une attention particulière sera apportée à la surveillance des animaux et à leur suivi dès lors que les animaux recevront un traitement chronique, puisqu'actuellement, nous ne pouvons que très difficilement prévoir les signes de détresses ou effets secondaires induits par de nouveaux candidats médicaments. Cependant, un suivi journalier des animaux sera effectué par les zootechniciens afin de déceler l'apparition de points critiques tels qu'un comportement atypique (vocalisation, prostration, agressivité vis-à-vis de ces congénères, difficulté à se nourrir, se déplacer, à se toiletter), la présence d'une déshydratation et/ou perte d'appétit. L'apparition d'un ou de plusieurs de ces points critiques entraînera la mise en cage individuelle de l'animal afin de lui apporter les soins nécessaires et de le suivre pendant 48 à 72h.

En accord avec la règle de raffinement, les procédures chirurgicales seront réalisées sous anesthésie générale avec maintien de la température corporelle via l'utilisation de plaque chauffante.

Le nombre d'animaux nécessaire à ce projet sur 5 ans sera de 1020 mâles à raison de 12 animaux par lot (minimum nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs). L'efficacité des molécules pourra être évaluée selon 3 approches différentes (analyse mictionnelle, hyperplasie et inflammation de la prostate) et ce, sur le même animal. De plus, l'analyse du profil mictionnel par l'utilisation de cage à métabolisme est une méthode non-invasive qui permettra donc de suivre au cours du temps, sur un même animal, l'effet des molécules testées. Ainsi, ce projet sera réalisé selon les exigences de la règle des 3-R (remplacement, réduction et raffinement)..

15967 L'intestin humain et celui des animaux sont peuplés de micro-organismes dont l'ensemble constitue le microbiote intestinal. Ces dernières années, de nombreuses études ont montré l'influence du

microbiote intestinal sur le développement et le fonctionnement du cerveau. En particulier, le rôle du microbiote intestinal est suspecté dans les troubles du spectre autistique (TSA). Les TSA sont un éventail de troubles neurodéveloppementaux qui nuisent à la capacité de l'individu à communiquer avec les autres et causent des comportements répétitifs (stéréotypies). La contribution possible du microbiote intestinal est soutenue par les faits suivants les individus atteints de TSA ont 4 fois plus de troubles gastro-intestinaux que les individus non atteints, et un microbiote intestinal différent en termes de composition et d'activités métaboliques des modèles de souris de laboratoire reproduisant les particularités comportementales des TSA ont aussi un déséquilibre du microbiote intestinal des traitements modifiant la composition du microbiote intestinal ont permis, chez des petits groupes d'enfants atteints de TSA, comme chez des modèles de souris de laboratoire, de diminuer les troubles du comportement pendant la durée du traitement. Le but de ce projet est d'approfondir l'étude des relations entre microbiote intestinal et TSA. Il fait partie du projet européen Gemma (Génome, environnement, microbiome et métabolome dans l'autisme), financé par l'Union Européenne et destiné à mieux caractériser les relations entre génétique, microbiote et environnement dans le développement des TSA (<https://www.gemma-project.eu/>).

Dans une première expérience, nous chercherons à démontrer le rôle causal du microbiote intestinal dans les TSA en transférant le microbiote intestinal d'enfants atteints ou non de TSA à des souris initialement dépourvues de microbiote intestinal (souris axéniques). Il est maintenant établi que les souris axéniques souffrent d'anomalies du fonctionnement cérébral et du comportement, en particulier d'une moindre aptitude aux interactions sociales. Nous faisons l'hypothèse que les capacités comportementales des souris colonisées avec le microbiote d'enfants non atteints de TSA s'amélioreront, alors que celles des souris colonisées avec le microbiote d'enfants atteints de TSA resteront identiques, voire se détérioreront. Si cette première expérience prouve cette hypothèse, nous conduirons une deuxième expérience dans laquelle nous chercherons à améliorer les capacités comportementales de souris colonisées avec le microbiote d'enfants atteints de TSA en les traitant avec des compléments alimentaires capables de corriger des déséquilibres du microbiote (exemple bactéries probiotiques).

Préalablement à ces deux expériences principales, nous conduirons deux expériences préliminaires destinées à choisir la lignée de souris axéniques la plus adaptée à notre projet. La première expérience préliminaire consistera à identifier la lignée dont les troubles comportementaux dûs à l'absence de microbiote intestinal sont les plus marqués. Dans la deuxième expérience préliminaire, nous vérifierons que les souris de cette lignée axénique, une fois inoculées avec des microbiotes humains, en reproduisent la composition le plus fidèlement possible.

Pratiquement, les expériences consisteront à inoculer des suspensions de microbiotes fécaux humains dans l'intestin de souris axéniques, en leur administrant l'inoculum par voie orale à l'aide d'une sonde de gavage en plastique souple. Une fois l'intestin colonisé, ce qui requiert à peu près 3 semaines, des prélèvements de selles seront effectués toutes les 2-3 semaines pendant toute l'expérience (15 semaines maximum) pour analyser la composition du microbiote intestinal des souris (des selles sont émises spontanément par les souris lorsqu'on les prend dans leur cage). Les souris effectueront aussi des tests comportementaux test d'anxiété consistant à placer la souris 5 minutes dans une enceinte qu'elle ne connaît pas et à y analyser ses déplacements (une souris anxieuse se déplacera peu et restera plus volontiers dans les coins, le long des murs de l'enceinte) test d'interaction sociale consistant à évaluer le degré d'interaction avec un congénère inconnu (une souris dont le comportement social est déficient interagira peu) test de stéréotypie consistant à mesurer, pendant une durée déterminée, le nombre de fois où la souris se toilette (un nombre élevé reflète un comportement répétitif) test cognitif consistant à évaluer les capacités de la souris à distinguer un objet familier d'un objet nouveau, et à mémoriser la position de ces objets dans l'espace. Toutes les souris seront individuellement identifiées par l'injection sous-cutanée d'un transpondeur, tels que ceux utilisés en pratique vétérinaire pour identifier les animaux de compagnie. En fin d'expérience, les souris seront euthanasiées et du sang, leur intestin et leur cerveau seront prélevés pour analyses.

Parmi les procédures conduites pendant la vie des souris, seules l'injection du transpondeur et l'administration orale du microbiote occasionneront une douleur légère et temporaire les tests

d'anxiété et d'interaction sociale provoqueront une anxiété temporaire pendant la durée du test (moins d'une demi-heure pour l'ensemble des deux tests). Les autres procédures n'occasionneront ni douleur, ni souffrance, ni angoisse. Toutes les procédures seront conduites par du personnel expérimenté. Pendant toute la durée des expériences, les souris vivront en groupes sociaux de 2 à 5 souris, et recevront nourriture et eau à volonté. Leur milieu de vie sera enrichi par des bâtonnets à ronger, du papier à déchiqueter et des tunnels pour se cacher. Une surveillance quotidienne depuis l'extérieur des cages et un examen clinique hebdomadaire lors du nettoyage des cages seront effectués.

Des expériences précédentes et d'autres rapportées dans la littérature scientifique indiquent que des effectifs de 15 souris par groupe (pour les études de comportement de la première expérience préliminaire et des deux expériences principales) et de 10 souris par groupe (pour les analyses de microbiote de la deuxième expérience préliminaire) sont suffisants pour analyser statistiquement les résultats et les exploiter. Pour tenir compte du fait qu'une contamination bactérienne accidentelle des souris axéniques pourrait se produire, ce qui nécessiterait de recommencer l'expérience concernée, nous prévoyons un effectif supplémentaire de secours. Au total, nous utiliserons au maximum 427 souris.

15968 L'aquaculture est un secteur alimentaire en pleine expansion qui doit relever le défi du développement d'une production durable, tout en faisant face à des pertes économiques majeures due à la survenue d'infections dans les élevages. Les salmonidés, y compris la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), sont des espèces d'élevage importantes sur le plan économique, dont la production intensive dans les installations aquacoles est associée à une sensibilité accrue aux maladies causées par des virus, des bactéries, des champignons et des parasites. Ces installations sont sujettes à des épidémies avec un taux de mortalité élevé chez les juvéniles qui sont immunologiquement immatures et pour lesquels la vaccination n'est pas envisageable, constituant ainsi une limitation importante pour la production de poissons. Afin de faire face à ces maladies infectieuses, le recours aux antibiotiques représente la méthode la plus couramment utilisée mais est incompatible avec une aquaculture durable. Bien que le rôle de la flore microbienne naturelle dans la protection contre les infections (plus couramment appelé l'effet probiotique) est reconnu, la sélection des bactéries probiotiques reste souvent empirique ou entravée par la faible reproductibilité des essais *in vivo*. Ces essais sont souvent effectués dans des conditions relativement incontrôlées avec une variabilité importante dans la composition microbienne interindividuelle. Ce manque de reproductibilité met en évidence la nécessité d'avoir recours à des modèles animaux pertinents et des procédures d'infection robustes, et de développer une meilleure connaissance de l'interaction bactérie-hôte. Dans ce contexte, des modèles d'infection contrôlés sans germes (axéniques) ou gnotobiotiques (à flore connue et contrôlée) doivent être mis au point pour étudier les processus infectieux chez les poissons d'élevage d'intérêt économique.

Notre projet a pour objectif de développer un modèle de larves de truite arc-en-ciel axéniques pour étudier la résistance à la colonisation par des pathogènes conférée par le microbiote de l'hôte, et identifier les mécanismes à la base de cet effet d'un point de vue écologique et moléculaire. Plus précisément, ce projet vise à caractériser les interactions hôte-pathogène-microbiote, en tentant de déterminer les facteurs de protection développés par le microbiote ainsi que l'influence de l'hôte, principalement via l'étude de la réponse immunitaire et des analyses histologiques. Ce projet permettra d'identifier des bactéries probiotiques capables de protéger la truite arc-en-ciel contre une infection par des pathogènes invasifs tandis que l'identification de mécanismes moléculaires responsables de l'effet protecteur aboutira, de manière plus générale, à une meilleure compréhension du rôle du microbiote dans la santé de l'hôte.

Ce projet requiert l'emploi de 5375 larves sur 5 ans.

Ce projet comporte deux procédures. La première concerne la mise au point du modèle (infection par différents pathogènes invasifs de larves axéniques et conventionnelles). La deuxième concerne l'étude de la résistance à la colonisation conférée par un ou plusieurs membres de la flore naturelle face à un pathogène identifié (exposition aux bactéries commensales à 22 jours post éclosion (jpe) et infection par le pathogène invasif à 24 jpe de différents groupes de larves (axéniques,

gnotobiotiques, conventionnalisées avec un consortium bactérien contrôlé à 22 jpe, ou conventionnelles). Ces deux procédures sont de classe sévère puisqu'elles entraînent la mort des larves de truite arc-en-ciel axéniques.

Néanmoins, ce projet respecte la règle des 3R, en utilisant un vertébré inférieur et un nombre minimum d'animaux permettant tester les hypothèses et vérifier la reproductibilité des expériences. Dans le cadre du raffinement, une observation quotidienne des poissons sera réalisée et les poissons ne seront pas conservés plus de 35 jours post-éclosion pour limiter leur inconfort au vu de notre procédure d'élevage. Tandis que nos expériences consistent à évaluer la capacité des pathogènes sélectionnés à infecter et tuer les larves, des points limites sont établis pour limiter la souffrance des poissons au maximum. Ainsi, l'observation d'une absence de réaction au stimulus (absence de nage), d'inappétence ou d'abcès au niveau des branchies conduira à la mise à mort des animaux par surdose d'anesthésique.

15969 Les porcs sont généralement nourris avec des aliments de bonne qualité et de bonnes valeurs nutritionnelles, qui peuvent être fabriqués à partir de matières premières produites dans des pays étrangers. Ces aliments peuvent être remplacés par des aliments de moindre qualité, mais valorisant des sources locales de nutriments. Les porcs qui sont présents dans les élevages sont des descendants de lignées capables d'utiliser efficacement les aliments de bonne qualité, mais moins efficacement les aliments de qualité moindre. La première utilisation doit être mesurée au niveau du tube digestif, et elle correspond à la capacité digestive de l'animal. Le projet vise à développer une méthodologie rapide d'estimation de la capacité digestive des animaux, qui pourrait être utilisée dans les élevages. Pour cela, 200 porcs seront utilisés afin de mesurer l'utilisation digestive de 4 régimes à différents âges. Les porcs seront d'abord adaptés pendant 11 jours à leur régime puis leurs fèces et leurs urines seront collectées pendant 10 jours. A la fin du protocole, un échantillon de fèces fraîche sera prélevé. Le présent protocole a été élaboré dans le respect de la règle des 3R. Remplacement les mesures sur animaux sont requises car l'objectif de l'étude est de déterminer l'utilisation digestive des nutriments et de l'énergie chez les porcs et il n'est pas possible d'étudier l'utilisation digestive des nutriments autrement que sur un animal entier et vivant. Réduction le nombre d'animaux et le dispositif expérimental mis en place ont été déterminés sur la base d'essais antérieurs afin de disposer d'une base de données suffisantes pour le développement méthodologique du projet. Raffinement afin de limiter l'hébergement en cage à digestibilité limitant les mouvements de l'animal, les animaux seront d'abord hébergés dans des cages leur permettant de se retourner. Les cages seront placées de façon à permettre un contact visuel, sonore, olfactif et tactile entre les animaux. Les animaux seront commercialisés en fin de protocole pour la production de viande.

15970 L'addiction aux drogues d'abus représente un problème majeur de santé avec des conséquences sociales et économiques dramatiques. Les années 2000 ont vu progressivement s'installer sur le marché international des drogues, une nouvelle catégorie de substances d'abus, les nouvelles substances psychoactives (NPS). Aussi dénommées « Stimulants légaux », ces substances imitent les effets de substances illicites connues (cocaïne, morphine, cannabis) en adoptant une structure chimique légèrement différente, leur permettant d'être vendues légalement. Les fabricants ont une longueur d'avance sur la législation en synthétisant de nouvelles substances plus rapidement que la classification en produits stupéfiants de celles déjà existantes. La facilité de fabrication, la difficulté de classification, et la baisse de qualité des drogues connues, ont permis aux NPS de se répandre, constituant aujourd'hui un problème majeur de santé publique. Les professionnels de la santé s'entendent pour dire que ces drogues présentent un potentiel toxique et de dépendance important.

Malgré les données précliniques obtenues au cours de ces dernières années en recherche pour comprendre les mécanismes d'actions de ces nouveaux produits, les mécanismes exacts restent incompris. Vu le nombre croissant de molécules qui apparaissent chaque année et le nombre croissant d'intoxications aux NPS, il est primordial de mieux comprendre leurs effets afin de mieux traiter les utilisateurs.

Pour comprendre les mécanismes neurocomportementaux de ces nouvelles drogues d'abus il faut caractériser les effets comportementaux afin d'en informer les pouvoirs publics et les professionnels de la santé.

L'étude des neuroadaptations induites par les drogues d'abus pouvant conduire à la dépendance nécessite l'utilisation de modèles animaux. Différents modèles ont été développés. Ces modèles animaux développés principalement chez le rongeur, en considérant les fortes homologies physiologiques et comportementales inter-espèces, permettent une extrapolation mesurée de certaines données du rongeur à l'homme. L'objectif principal de notre projet, est d'identifier le potentiel addictif et de caractériser les effets des NPS sur l'état émotionnel et cognitif des animaux. Puis afin de mieux comprendre les effets observés nous souhaitons caractériser et explorer des hypothèses mécanistiques par des approches fonctionnelles et moléculaires au niveau du système nerveux central chez des souris exposées aux NPS. Notre projet est prévu pour durer 5 ans et nécessite 1530 souris. Des administrations intrapéritonéales de NPS seront effectuées afin de suivre leur comportement et de prélever le sang et le cerveau pour des études pharmacocinétiques et moléculaires.

Les adaptations neurocomportementales et moléculaires induites par la prise de drogues d'abus sont trop complexes pour être modélisées *in vitro*, ce projet nécessite l'utilisation d'animaux. Néanmoins nous satisferons aux exigences (1) de réduction, en limitant strictement le nombre d'animaux à celui nécessaire à la validité statistique des résultats obtenus et (2) de raffinement, en limitant au maximum le stress et la douleur des animaux au cours des expériences (hébergement dans des cages avec litière et copeaux, suivi régulier du bien-être des animaux, définition de points limites au-delà desquels les animaux doivent être euthanasiés). En revanche, le remplacement des rongeurs par des invertébrés, très éloignés de l'Homme en terme de neuroadaptation, ou par des approches *in silico*, incapables de modéliser des processus aussi complexes, ne permettrait pas de répondre aux questions posées.

En conclusion, nos résultats nous permettront de mieux comprendre les effets neurocomportementaux et moléculaires des NPS dans l'objectif d'améliorer la prise en charge clinique.

15971 Tout expérimentateur est amené à acquérir, entretenir ou perfectionner les techniques nécessaires à la mise en œuvre de projets autorisés utilisant des animaux à des fins scientifiques. Ce projet est dédié exclusivement à l'entraînement du personnel sur les gestes techniques nécessaires à la bonne réalisation des études pharmacologiques *in-vivo*. Ce projet a pour but de permettre au personnel expérimentateur de consolider ses compétences techniques sur des gestes déjà maîtrisés dans l'équipe et qui sont ou ont été mis en œuvre dans le cadre d'autres projets autorisés ou d'en acquérir de nouvelles. Par ailleurs, cela répond à une obligation réglementaire. Enfin et surtout, la maîtrise du geste technique par l'expérimentateur contribue au bien-être animal en réduisant les risques de stress et de douleur pour l'animal.

Malgré de nombreuses recherches, aucun modèle de substitution à l'animal n'est encore suffisamment sophistiqué pour exercer ces entraînements. Il n'y a donc pas d'autres choix, actuellement, que de les réaliser sur des souris anesthésiées ou vigiles.

En cancérologie, la recherche de nouveaux candidats médicaments nécessite la réalisation d'administrations chroniques et aiguës en intraveineuse, intrapéritonéale et Per Os chez la souris pour évaluer nos composés. L'évaluation de l'efficacité de ces candidats sur les tumeurs requiert des implantations (greffes) en sous-cutanée, intradermiques et intramammaires pour la mise en place de modèles de xénogreffe ou d'allogreffe de tumeurs humaines ou murines ainsi que des prélèvements sanguins, sur animaux vigiles ou anesthésiés, pour les études de pharmacocinétique ou les analyses hématologiques. Ces études nécessitent également des autopsies à leur issue et des prélèvements d'organes/tumeurs pour les études pharmacodynamiques et les analyses *ex-vivo*. Tous ces gestes doivent donc être parfaitement maîtrisés par le personnel impliqué dans les études.

Les gestes techniques, comme les prélèvements sanguins, par exemple, ne peuvent à l'heure actuelle être correctement totalement acquis autrement que chez un animal vivant, les moyens de substitution étant encore insuffisamment similaires à l'organisme vivant et ne pouvant constituer qu'une étape préliminaire à cette acquisition.

Les animaux utilisés dans le cadre de ce projet sont en majorité issus d'un premier projet permettant leur réutilisation. Dans notre axe de recherche en oncologie, il s'agit généralement d'animaux greffés non traités, non inclus après les étapes de randomisation ou d'animaux témoins sains non traités issus d'études pharmacologiques. Cette réutilisation des animaux permet de valoriser les animaux inclus dans les études et contribue fortement à la règle des 3R par la réduction du nombre d'animaux. Leur réutilisation est systématiquement encadrée par avis vétérinaire ou SBEA en délégation afin d'assurer leur bon état général avant d'intégrer ce projet. La plupart des gestes réalisés sont non invasifs, peu stressants et ne nécessitent pas d'anesthésie générale. Pour quelques cas particuliers, impliquant par exemple certains prélèvements sanguins, une anesthésie générale est effectuée afin de limiter toute souffrance. De plus les prélèvements sanguins non terminaux respectent obligatoirement les volumes sanguins physiologiques et durées minimales de récupération pour les souris (selon les recommandations européennes actuelles).

Les souris en cours d'expérimentation font l'objet d'un suivi clinique spécifique par les expérimentateurs et les zootechniciens de façon quotidienne. Ce suivi est complété d'une évaluation de la taille et de la croissance tumorale dans le cas où les souris auraient été greffées au préalable de leur réutilisation dans ce projet, au minimum 2 à 3 fois par semaine pour anticiper l'atteinte des points limites spécifiques (volume, aspect...).

Les souris sont soit immunocompétentes (c'est-à-dire avec un système immunitaire parfaitement fonctionnel), soit immunodéprimées (c'est-à-dire avec système immunitaire déficient voir totalement absent), en fonction du premier projet autorisé réalisé sur ces souris.

Les souris immunodéprimées étant extrêmement sensibles à l'environnement extérieur, elles sont protégées dans un secteur à confinement spécifique avec des procédures d'accès, des conditions d'hébergement et de manipulation strictes appliquées par tout le personnel y intervenant, afin de prévenir tout risque de contamination.

Les souris sont hébergées en groupes sociaux tout au long des entraînements, dans des cages enrichies de « cocoon » pour favoriser leur instinct de nidification. Cet enrichissement permet également de surveiller leur état général par observation de leur comportement vis-à-vis de cet enrichissement.

Suite aux dernières orientations stratégiques de la société, il est apparu nécessaire de former notre personnel de zootechnie à certains gestes techniques pratiqués en Oncologie en complément de la formation réglementaire pour l'application des procédures expérimentales. Pour ce faire, nous avons organisé, sur les 6 derniers mois, une formation personnelle et adaptée, sous forme de tutorat, en s'appuyant sur une demande d'autorisation existante. Seulement cette autorisation n'étant prévue initialement que pour la formation d'un faible nombre d'expérimentateurs sur 5 ans, elle ne présente pas suffisamment d'animaux pour la formation d'un plus grand nombre. Il est donc nécessaire de réajuster la quantité d'animaux dans ce nouveau projet.

Au vu des formations restant encore à venir, nous pensons utiliser 1300 animaux sur 5 ans, dont les 3/4 minima seront réutilisés de projets précédents. Cela représente 26 sessions d'entraînement/an, au total, pour l'ensemble de l'équipe.

15972 Les plumes issues d'abattoirs sont utilisées pour la production d'acides aminés (AA) naturels destinés à l'industrie pharmaceutique et l'alimentation animale. Lors du processus d'extraction un sel très pur est produit. Dans un contexte où l'utilisation et la valorisation de sources de protéines non conventionnelles et locales sont encouragées, cette production d'AA et donc de sel sont en augmentation.

Pour la commercialisation du sel à des fins d'alimentation animale, et principalement pour le porc, il est nécessaire de disposer de plus d'informations sur ce sel, notamment sur son appétence puisque ce sel contient quelques résidus d'AA et présente une odeur caractéristique.

Dans ce projet, nous souhaitons comparer l'appétence d'un aliment standard pour porc en croissance contenant 0.45% de sel marin au même aliment mais contenant 0.45% de sel issu de l'hydrolysate des plumes en remplacement du sel marin. Le projet sera réalisé sur 20 porcs d'environ 30kg, hébergés en loges individuelles équipées d'auges doubles. Pendant 2 semaines, 2 fois par jour, les 2 aliments seront distribués simultanément après avoir retiré et pesé les refus de la distribution précédente et en respectant une alternance journalière du côté d'auge. A chaque distribution, le premier choix de chaque porc sera enregistré.

Le protocole a été élaboré dans le respect de la règle des 3R :

- Remplacer Ces tests d'appétence nécessitent l'utilisation d'animaux vivants car nous ne disposons pas d'autre méthode d'évaluation de l'appétence;
- Réduire Le nombre d'animaux et la durée de l'essai ont été déterminés sur la base d'essais antérieurs afin d'atteindre le niveau de précision souhaité pour l'analyse des éléments mesurés
- Raffiner L'utilisation de loges individuelles est nécessaire afin de mesurer la consommation individuelle d'aliment. Ces loges, dont les dimensions permettent à l'animal de se déplacer et de se retourner librement, sont munies de barreaux et en contact les unes avec les autres, permettant un contact visuel, sonore, olfactif et tactile entre les animaux. Les animaux seront hébergés ainsi uniquement pendant l'essai et seront en loges collectives avant et après l'expérimentation.

15973 Dans la cellule, l'ADN (Acide désoxyribonucléique) est le support de l'information génétique qui est essentiel au développement, fonctionnement et reproduction des êtres vivants. L'information génétique est présente sous la forme de gènes qui sont un enchaînement de bases nucléotidiques (base de la structure de l'ADN). Ces gènes sont alors copiés en ARNs (Acide ribonucléique) qui peuvent alors soit avoir une fonction physiologique propre (ARNs non codant) soit servir à la production de protéines (ARNs codant). Les ARNs constituent un élément clef pour le bon fonctionnement de la cellule et leur régulation est donc importante pour la survie de la cellule.

Chez les eucaryotes, l'équilibre entre la synthèse et la dégradation des ARNs est primordial et un des acteurs central impliqué dans ce processus est le complexe protéique « exosome ». Ce complexe est très conservé chez la plupart des espèces eucaryotes allant de la levure à l'Homme. Au sein de ce complexe, EXOSC10/Rrp6 est une protéine jouant un rôle important dans la maturation, le contrôle des niveaux et la qualité des ARNs. Ce facteur associé à d'autres protéines permet ainsi le contrôle de la division et du développement des cellules. Chez le mâle, il a été montré récemment qu'Exosc10 intervient dans la division des cellules germinales (cellules permettant la production des gamètes ou spermatozoïdes).

Notre objectif est de comprendre les rôles potentiels d'Exosc10 dans la gestion des ARNs au cours de la formation des gamètes (ovocytes) chez la femelle. L'approche *in vivo* doit aider à mieux comprendre les voies de régulation complexes et notamment d'identifier de nouvelles voies importantes dans la régulation de la gamétogenèse.

Les données obtenues pourront apporter de nouvelles informations pour le domaine de l'oncologie parce qu'EXOSC10 est impliqué dans certains cancers et est notamment inhibé par la drogue 5-fluorouracil (5-FU) utilisée en chimiothérapie.

Le projet comprend l'étude d'une lignée murine dont le gène Exosc10 est inactivé spécifiquement dans la lignée germinale des ovaires. Ces souris femelles présentent un dysfonctionnement dans la production des gamètes. Lors de la formation des gamètes, la régulation hormonale joue un rôle important et par conséquent, nous allons contrôler les niveaux hormonaux chez les souris mutantes pour Exosc10. Pour vérifier si la gamétogenèse est complète et fonctionnelle avec ovulation, des expériences de stimulation ovarienne seront effectuées. Ce processus contrôlé permet de mieux comparer les animaux entre les groupes contrôles et mutants.

Les différentes procédures expérimentales ont été élaborées dans le respect de la règle des 3R

Remplacer Les premières études sur le facteur Exosc10/Rrp6 ont été effectuées dans les modèles de levure *Saccharomyces cerevisiae* et de cellules mammifères humaines. Cela a permis de mieux comprendre son fonctionnement au niveau d'une cellule. Afin d'étudier le facteur dans un système

complexe composé de nombreuses cellules et de comprendre quelle est sa fonction physiologique (fonction au niveau du développement, de la reproduction... ?), il est nécessaire de poursuivre l'étude de ce facteur en utilisant le modèle animal. Cela peut permettre de comprendre les effets possibles de mutations génétiques trouvées chez l'Homme.

Réduire Les différentes procédures expérimentales proposées sont bien maîtrisées par le personnel. Par conséquent, le nombre d'animaux peut être réduit au minimum de manière à obtenir des résultats statistiquement significatifs et scientifiquement valides. Pour ce projet, un maximum de 60 souris doit être utilisé.

Raffiner Tous les animaux sont hébergés dans une structure agréée qui tient compte de l'éthique animale et assure le suivi quotidien 7 jours sur 7. Les animaux sont hébergés au nombre maximum de 4 par cage. Pour l'enrichissement, les animaux ont un nid végétal à base de fibres courtes de coton (de type Nestlet). Les procédures expérimentales sont réalisées par un personnel ayant toutes les formations nécessaires. Lors des procédures expérimentales nécessitant une chirurgie, une anesthésie accompagnée d'une analgésie est accomplie et un suivi post-opératoire avec une mise en place de points limites suffisamment précoces est effectué afin de réduire au minimum l'inconfort et la douleur de l'animal.

15974 L'accident vasculaire cérébral (AVC) ischémique est une pathologie neurologique survenant après l'occlusion d'une artère irriguant le cerveau. Cette pathologie est la 3ème cause de mortalité et la première cause de handicap acquis chez l'adulte dans le monde. En France, cent trente mille nouveaux cas sont répertoriés par an. L'AVC pose donc un problème majeur tant dans le domaine de la santé publique que sur le plan humain. Actuellement, la prise en charge des patients à la phase aiguë de l'infarctus cérébral est réalisée par l'injection intraveineuse de l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) associée ou non à la thrombectomie. Toutefois, seule une faible proportion des patients (<10%) peut être traitée du fait des effets secondaires de l'injection de tPA et de la relative difficulté d'accès à la thrombectomie. Ainsi, il paraît indispensable de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques innovantes visant à traiter efficacement cette pathologie.

Une étude pilote est nécessaire afin de valider, auprès de l'industriel, le modèle d'AVC et la bonne implantation des cellules CTX chez le rat, lui permettant ainsi d'effectuer ses analyses ex-vivo.

Le but de l'étude est d'évaluer la survie et expliquer comment l'implantation de cellules CTX se développent dans un environnement lésionnel et ainsi étudier la récupération fonctionnelle post-AVC chez le rat. Pour cela, nous utiliserons un modèle d'ischémie-reperfusion. Ainsi, l'AVC sera induit sur des rats Sprague-Dawley mâles âgés de 12 semaines, en utilisant le modèle d'AVC intraluminale dont le principe repose sur l'insertion d'un monofilament dans la carotide interne droite de l'animal puis pousser jusqu'à la base de l'artère cérébrale moyenne (ACM).

Ce modèle est aujourd'hui très bien caractérisé chez le rat et toutes les procédures seront organisées afin de se conformer à la règle des 3Rs, ainsi toutes les manipulations douloureuses seront réalisées sous anesthésie générale avec couverture analgésique pour éviter toutes douleurs, souffrances et angoisses. Réduction De plus, les données de la littérature ainsi qu'une étude de puissance statistique en amont permettent de nous assurer que nous utiliserons le nombre minimal d'animaux pour pouvoir valider le modèle chirurgical et l'implantation de cellules CTX sur une partie du cerveau lésée (n=40).

Notre étude pilote correspond à l'étape de validation *in vivo* d'un modèle de chirurgie et d'implantation de cellules chez le rat. Cette étude pilote est la suite de travaux *in vitro* réalisés antérieurement par cet industriel. Remplacement Aucun modèle informatique permettant de modéliser de tels mécanismes n'est à ce jour disponible. Ainsi, la validation d'un modèle de chirurgie et de l'implantation de cellule ne peut se faire que sur un organisme entier et vivant, et ne nous permet donc pas d'utiliser d'autres moyens que de tester chez l'animal.

Raffinement Les expériences seront réalisées par du personnel qualifié en respectant les règles de bonnes pratiques de laboratoire pour le respect des animaux, tout en veillant à ne pas dépasser les points limites fixés au préalable. Le bien-être des animaux sera suivi bi-quotidiennement par du personnel qualifié 5j/7 et quotidiennement pendant les week-ends et jours fériés et cela pendant

toute la durée du projet. Les animaux seront hébergés dans des cages standards répondant aux normes européennes actuelles (Directive 2010/63/UE). Pour éviter de stresser les animaux, les cages seront isolées de tout bruit extérieur et l'accès à l'eau et à la nourriture sera ad libitum. Enfin, une importance particulière sera apportée au bien-être des animaux. Tout sera mis en œuvre pour réduire l'angoisse, la souffrance et la douleur de chaque animal, pouvant être occasionnées pendant le projet. Les principes éthiques et les standards de raffinement seront utilisés jusqu'à la mise à mort de l'animal.

15975 CONTEXTE : Le cancer de la vessie est l'un des cancers les plus fréquents, le quatrième cancer chez les hommes en Europe. Détecté tardivement, ce cancer est particulièrement agressif, avec peu d'options thérapeutiques. Dans 25% des cas, la tumeur envahit le muscle vésical (TVIM) et le traitement standard des TVIM est l'ablation chirurgicale de la vessie. Cependant, des alternatives thérapeutiques visant à préserver la vessie apparaissent de plus en plus en combinant chimiothérapie et radiothérapie.

OBJECTIF : Nous visons à améliorer le traitement conservateur de la vessie grâce à un traitement combiné alliant une thérapie ciblée couplée à la radiothérapie. Nous avons montré *in vitro* qu'un récepteur membranaire est fortement surexprimé dans le cancer de la vessie alors que son niveau reste bas dans le tissu vésical avoisinant. Nous avons également montré que les cellules cancéreuses sont dépendantes de l'expression de ce récepteur pour leur croissance et que l'absence de son expression induisait une sensibilité accrue à la radiothérapie. Afin de valider l'efficacité anti-tumorale de ce traitement combiné, et avant de pouvoir le tester chez les patients, nous proposons de confirmer ces résultats *in vivo* en utilisant les mêmes lignées cellulaires mais ici greffées chez la souris.

Cette étude évaluera les résultats obtenus précédemment *in vitro* dans un modèle préclinique de souris portant des xénogreffes de trois lignées cellulaires humaines étudiées *in vitro*. Ce modèle permet d'évaluer la toxicité et l'efficacité du traitement en présence d'un système vasculaire et d'une architecture tumorale qu'il est impossible de reproduire intégralement dans des modèles de culture cellulaire *in vitro*. Seule l'utilisation de ce nouveau protocole dans ces conditions permettra d'évaluer l'efficacité anti-tumorale de ce nouveau traitement.

AVANTAGES / LIMITES Cette étude répond à un réel besoin clinique puisqu'elle doit permettre de valider un nouveau traitement dans une pathologie pour laquelle les options thérapeutiques sont très limitées. La mise en œuvre de l'étude peut générer du stress et une douleur très modérée chez les souris lors de l'injection des cellules tumorales ou des traitements.

LE NOMBRE D'ANIMAUX UTILISES Au total, nous utiliserons 528 souris.

CONFORMITÉ AUX 3R :

* REMPLACER : Nous avons mené des études *in vitro* sur des cellules humaines issues de cancer de la vessie afin de valider notre hypothèse. Il est maintenant essentiel de vérifier ces résultats sur un modèle animal.

* REDUIRE : Le nombre d'animaux de notre étude est limité au strict minimum, grâce aux résultats d'études antérieures menées par notre équipe et disponibles dans la littérature, permettant de définir les doses de molécules à utiliser ainsi que les conditions de greffes. Les modalités des traitements combinés ont également été définies en effectuant une synthèse des travaux similaires publiés.

* RAFFINER : Conformément aux recommandations internationales, les souris seront suivies quotidiennement pour s'assurer de leur bien-être et les expériences seront arrêtées avant que le volume de la tumeur ne puisse entraîner des souffrances chez les animaux. Les souris seront sacrifiées en cas de perte de poids de plus de 20% ou en cas de souffrance apparente pouvant se traduire par une perte de mobilité.

15976 Les maladies autoimmunes (MAI) représentent aujourd'hui la troisième cause de mortalité dans les pays développés, après les affections cardio-vasculaires et les cancers. Il existe plus de 80 MAI parmi lesquelles les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), telles que la maladie

de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH), pour lesquels les traitements sont encore non satisfaisants. En effet, la prise en charge des MICI fait appel à des traitements présentant de nombreux effets indésirables, un fort taux de non-réponse, ainsi que taux d'échappements thérapeutiques importants. Ces pathologies (RCH et MC) sont dues entre autres à un dysfonctionnement du système immunitaire, en particulier contre la flore intestinale, et notamment à une mauvaise régulation des lymphocytes T (LT).

Dans un modèle de rejet greffe d'organe solide, des résultats ont précédemment montré que la protéine IL-34 de rat était capable d'induire une tolérance à l'allogreffe de cœur chez le rat. De plus, nous nous sommes récemment intéressés à l'effet de l'IL-34 dans le traitement de réaction du greffon contre l'hôte (GvH) lors de greffes hématopoïétiques. Nous avons récemment mis en évidence un effet thérapeutique de l'IL-34 humaine dans un modèle murin humanisé de GvH, en association avec un immunosuppresseur, via une différenciation des macrophages vers un profil régulateur et un effet positif sur la survie et l'activité des lymphocytes T régulateurs (cf. saisine APAFIS #2162)

L'IL-34 humaine est donc un candidat prometteur de biothérapie active sur le système immunitaire humain dans le contexte de la greffe de cellules hématopoïétiques, et du traitement de la GvH, ainsi que dans le contexte du rejet de la greffe d'organes solides et des MICI, et pourrait permettre de proposer de nouvelles alternatives à l'arsenal thérapeutique déjà existant.

Au-delà de l'étude de l'IL-34 humaine « sauvage », plusieurs IL-34 modifiées ou mutées ont été synthétisées pour améliorer leur affinité pour le récepteur CSF1R, leur efficacité, ainsi que leur demi-vie. Des résultats prometteurs *in vitro* doivent maintenant être confirmés *in vivo* dans ces mêmes modèles, afin de les comparer à l'IL-34 native.

L'objet de cette saisine est d'évaluer le potentiel thérapeutique de la protéine humaine IL-34 native ou mutée, dans plusieurs modèles précliniques chez la souris humanisée, à savoir un modèle de GvH et un modèle de greffe de peau, ainsi que 2 modèles de colites inflammatoires. Ces modèles sont déjà développés au sein du laboratoire, et le mode d'administration a été optimisé lors de l'étude précédente (Saisine APAFIS #2162)

Dans cette saisine, la règle des 3R sera suivie comme suit

- Remplacer Les études fonctionnelles *in vitro* de l'IL-34 native et des IL-34 mutées, sur cellules humaines, donnent des résultats prometteurs quant à un effet biologique. Cependant, ces résultats sont limités par l'absence de contexte physiologique et de la complexité du système immunitaire. Le passage aux modèles *in vivo* chez des animaux humanisés (proche de l'homme, car mimant le système immunitaire humain) est indispensable pour évaluer l'effet immunorégulateur de cette cytokine humaine, et de comparer avec les nouvelles formes mutées de l'IL-34. Le modèle souris humanisée représente une alternative solide à l'utilisation pré-clinique de primates.

- Réduire Pour ce projet, le nombre minimum d'animaux sera utilisé, permettant d'obtenir des résultats robustes et significatifs, tout en palliant à la variabilité individuelle. Nous prévoyons donc que chaque groupe de traitement sera constitué de 10 souris, nombre nécessaire et suffisant pour réaliser des études statistiques (Log Rank test pour les courbes de survie, tests non paramétriques pour petits échantillons ($n < 30$)). Nombre total d'animaux 480 répartis sur les 2 modèles de GvHD et greffe de peau et sur les 4 modèles de colite (80 souris/modèle avec 8 groupes de 10 souris).

- Raffiner Les souris sont hébergées dans des cages ventilées aux normes, par groupe de 5 animaux maximum, et ont des formes d'enrichissements à leur disposition (Sizzle nest, tube, dôme) afin de réduire leur stress. Dans tous les protocoles mis en œuvre, les petites interventions invasives seront effectuées sous anesthésie gazeuse (prélèvements sanguins...). Les interventions chirurgicales plus longues seront effectuées sous anesthésie générale fixe, associé à une analgésie pré et post-opératoire. Les procédures décrites dans cette saisine étant très différents au niveau de la sévérité et de la rapidité d'apparition de la maladie, chaque protocole aura un suivi des animaux adapté aux signes cliniques attendus. Pour la GvHD et la greffe de peau, en l'absence de maladie les animaux seront d'abord suivis tous les 2 jours, puis quotidiennement dès l'apparition des premiers symptômes. Durant le protocole, les animaux seront suivis pour leur poids, le développement de la GvH et/ou du rejet de greffe. Les animaux atteignant une perte de poids de

20% par rapport à leur poids initial seront euthanasiés, ainsi que les animaux montrant des signes physiques caractéristiques d'un mal être tel qu'un changement de comportement. Des prélèvements sanguins seront effectués tous les 15 jours pour valider la persistance des cellules humaines injectées chez la souris NSG. Pour les protocoles de colite, les animaux seront suivis quotidiennement dès le début du protocole, au niveau du poids et de l'apparition de signes cliniques. Un score clinique sera établi en fonction de la perte de poids et de signes cliniques (posture, activité, aspect du poil, état général). Lorsque 3 signes cliniques notables ou 1 seul signe clinique sévère seront observés, l'animal sera euthanasié. Tous les animaux traités avec la molécule et ceux des groupes contrôles seront analysés post mortem avec des prélèvements d'organes, pour des analyses au niveau anatomopathologique pour les lésions dans les organes dues à la réaction de GvH et dans le greffon, et par immunohistologie pour étudier la migration des cellules injectées et mieux caractériser leurs mécanismes d'action.

15977 Depuis plusieurs années, l'intérêt s'est porté sur les propriétés régulatrices des acides aminés. Plus particulièrement, différents travaux, ont montré que la citrulline, un acide aminé n'entrant pas dans la production des protéines, était un puissant activateur de la production des protéines musculaires. De telles propriétés pourraient être mises à profit dans la prise en charge de pathologies atteignant la fonction musculaire. De plus, la citrulline thérapeutique préserve la fonction cardiovasculaire, en particulier via un effet vasculaire (vasodilatateur). En parallèle, une étude réalisée chez des rats âgés dénutris et confirmée chez l'Homme sain soumis à un régime hypoprotéique, a montré que la citrulline était capable de stimuler la synthèse protéique musculaire et d'augmenter le contenu protéique musculaire.

Ce projet étudiera les effets de la citrulline plasmatique, produite par une enzyme intestinale appelée OTC. En particulier, nous nous intéresserons aux effets de la citrulline endogène sur la fonction cardiovasculaire, la susceptibilité aux infarctus ainsi qu'au métabolisme énergétique myocardique. De ce fait, nous avons choisi de travailler sur une lignée de souris génétiquement modifiée nous permettant d'inactiver spécifiquement la production intestinale de citrulline et d'en évaluer les conséquences sur la fonction cardiovasculaire ainsi que le métabolisme énergétique.

Dans un premier temps, nous ferons un suivi longitudinal des fonctions cardiovasculaires et du métabolisme énergétique des souris sans la production de citrulline intestinale pendant 18 mois. Nous induirons un infarctus à une partie de ces souris et nous évaluerons les conséquences d'absence de production de la citrulline intestinale sur la récupération des souris.

Dans un deuxième temps, nous évaluerons les fonctions cardiaques et métaboliques chez des souris invalidées en citrulline intestinale sous un régime alimentaire hypoprotéique. Induction d'infarctus à une partie ces souris est envisagée dans le but d'étudier l'importance de l'état nutritionnel pour la récupération.

Le protocole a été établi pour satisfaire au mieux la règle des 3R

Remplacer L'objectif étant de mieux comprendre le rôle de la citrulline endogène dans les fonctions cardiovasculaires en général et dans des modèles de maladies cardiovasculaire, une étude *in vivo* est indispensable. Aussi, le modèle murin a été choisi pour cette étude car il est le seul connu permettant d'obtenir les modifications génétiques nécessaires à notre étude.

Raffiner L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long des procédures afin d'intervenir de manière rapide et appropriée au moindre signe clinique de douleur. De même des points limites seront établis afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus.

Réduire Au vu d'études préliminaires et dans le but d'obtenir une puissance statistique suffisante nous permettant de répondre de manière pertinente aux questions posées par l'étude, un minimum de 12 individus par sexe et par groupe a été établi. Ainsi, un total de 144 animaux sera nécessaire pour l'ensemble des procédures (72 souris pour un suivi longitudinal pendant 18 mois et 72 souris qui vont subir une ischémie/reperfusion). Tous les animaux passeront par le Laboratoire Radiopharmaceutiques Bioclinique (LRB) pour la réalisation des protocoles d'échocardiographie et ECG.

Le présent projet consiste donc en une procédure d'échographie réalisée sur des animaux inclus dans un protocole faisant déjà l'objet d'une autorisation.

L'imagerie échographique est un outil de choix pour cette étude cardiaque de manière non invasive. En effet, l'échographie cardiaque est un examen d'imagerie qui recourt aux ultrasons pour visualiser l'intérieur du cœur et l'ensemble des structures qui le composent, et pour apprécier son fonctionnement. L'échocardiographie est indiquée dans le cadre du diagnostic et de la surveillance d'une maladie cardiaque. Le protocole permettant d'obtenir les meilleures performances nécessitent d'être réalisé par une personne formée et compétente, c'est pourquoi les animaux sont généralement amenés sur la plateforme d'imagerie pour suivre l'examen échographique, mais une personne peut également être formée à cet examen. La procédure utilisée chez le petit animal est la même que celle développée en clinique, mise à part qu'elle nécessite une épilation du rongeur, car les poils sont échogènes, et l'anesthésie volatile légère de l'animal afin qu'il soit immobilisé pendant 10-30 minutes suivant le nombre de mesures nécessaires.

Au total, 288 animaux seront inclus dans cette procédure. Le protocole d'imagerie échographique qui sera mis en œuvre n'entraînera pas de douleur, souffrance ou angoisse car il est réalisé sur animal anesthésié. Ce type d'imagerie permet de réaliser un suivi au cours du temps des mêmes animaux, réduisant par là même le nombre d'animaux nécessaire à une étude.

15978 L'amélioration de l'utilisation digestive des nutriments est une contrainte forte pour réduire les coûts alimentaires chez le porc. La majorité du phosphore des matières premières végétales se trouve sous forme de phosphore phytique non utilisable par les monogastriques. L'ajout de phytase dans l'aliment a démontré son efficacité pour améliorer la disponibilité du phosphore des plantes et pour réduire le potentiel antinutritionnel des phytates chez le porc. Ce projet a pour objectif d'étudier l'efficacité d'une phytase sur la digestibilité iléale de l'énergie, des acides aminés et de certains minéraux chez des porcs en croissance nourris avec des aliments à base de céréales et de tourteaux d'oléagineux.

La digestibilité iléale des nutriments sera mesurée dans un dispositif comprenant un nombre maximal de 12 porcs de 35 kg en début d'expérience. Ce nombre d'animaux comprend les animaux mise en expérimentation (n=6) et les animaux gardés en réserve en cas de nécessité (dans le cas il nous faudrait remplacer des animaux dans le groupe initial des 6 porcs). Un total de 6 régimes seront formulés à base de céréales et de tourteaux d'oléagineux et seront supplémentés avec des phytases d'origine commerciales. Les régimes seront testés dans un dispositif en carré latin 6x6. Pour chaque période de mesure, les animaux seront collectés pendant 3 jours après 4 jours d'adaptation aux régimes.

Le projet a été élaboré dans le respect de la règle des 3R. Remplacement : les mesures sur animaux sont requises car l'objectif de l'étude est de déterminer l'utilisation digestive des nutriments et il n'est pas possible d'étudier l'utilisation digestive des nutriments autrement que sur un animal entier et vivant. Réduction le nombre d'animaux et le dispositif expérimental mis en place ont été déterminés sur la base d'essais antérieurs afin d'atteindre le niveau de précision souhaité pour l'intégration des résultats du projet dans des tables de composition nutritionnelle tout en limitant le nombre d'animaux et la durée d'hébergement dans des cages à digestibilité. Raffinement : Pour la mesure de la digestibilité iléale, l'anastomose iléo-rectale est la seule méthode permettant de collecter quantitativement les digesta de la fin de l'intestin grêle. Elle est mise en place sous anesthésie générale et une analgésie est appliquée pendant l'intervention et au cours de la période post-opératoire avec un suivi très attentif des animaux pendant toute la durée de l'expérience.

Suite à la crise du COVID, nous avons été dans l'obligation d'arrêter l'étude décrite dans cette saisine. Compte tenu du dispositif expérimental (carré latin complet), aucun échantillon ni résultat ne pourra être utilisé et nous sommes dans l'obligation de refaire totalement l'expérience. Cela explique le passage d'un effectif de 12 à 24 animaux.

15979 L'anorexie mentale (AM) est un trouble des conduites alimentaires (TCA) touchant 1 à 2 % de la population féminine et dont le taux de mortalité est élevé. Il s'agit d'une maladie psychiatrique chronique qui se caractérise par une restriction alimentaire volontaire, une peur intense de devenir

gros alors que le poids est faible et par une perturbation de l'image de son propre corps. La restriction alimentaire peut être à l'origine d'une dénutrition sévère et de complications médicales graves pouvant engager le pronostic vital à court, moyen ou long terme. En plus de la restriction alimentaire et de la perte de poids, les patients développent une hyperactivité physique et souffrent de symptômes d'anxiété et de dépression. Les causes exactes de l'anorexie mentale restent encore mal connues. Plusieurs hypothèses, telles que les prédispositions génétiques et environnementales, sont évoquées et font l'objet de recherches. Parmi les pistes les plus intéressantes et encore mal connues le rôle de la perturbation de la flore intestinale microbienne (microbiote intestinal) dans le déclenchement de la maladie. En effet ces patients souffrent de troubles intestinaux à type de douleurs, de ballonnements abdominaux et de constipation. Ces troubles sont souvent présents avant le début de la maladie et sont associés à une perturbation de l'équilibre du microbiote intestinal.

Récemment, des publications scientifiques ont mis en évidence la présence d'un déséquilibre du microbiote intestinal chez les patients dénutris avec AM, cependant son rôle potentiel dans l'apparition des symptômes de l'AM et de la perte de poids reste à explorer. Notre équipe a mis en évidence dans une étude de patients dénutris avec AM comparés à des sujets sains, une association entre la perturbation du microbiote intestinal et la présence et troubles intestinaux.

Dans ce projet de recherche, nous émettons l'hypothèse que les troubles intestinaux par le biais de la perturbation du microbiote, sont un des éléments déclencheurs de la restriction alimentaire. L'objectif de cette étude est de rechercher le rôle exact de la perturbation du microbiote intestinal dans l'apparition de la restriction alimentaire, de l'hyperactivité physique, et des troubles anxieux et dépressifs présents au cours de l'AM.

Afin de mettre en évidence ce lien, nous prévoyons de réaliser une transplantation fécale par gavage oral de selles de patientes dénutries dans le cadre d'une AM à un groupe de 12 souris axéniques (dépourvues de microbiotes commensaux) et de le comparer à un groupe de 12 souris transplantées à partir de selles de sujets sains du même sexe et du même âge, et à un groupe de 12 souris transplantées à partir de selles de sujets dits « maigres constitutionnels » (MC) ce sont des sujets à indice de masse corporelle inférieur à 16, qui ne présentent pas de troubles mentaux ou physiologiques, en dehors de leur maigreur. Nous rechercherons ensuite tous les changements au niveau du comportement alimentaire, du poids, de l'activité physique et de l'état d'anxiété et de dépression des deux groupes de souris.

Les deux modèles d'animaux axéniques les plus répandus sont ceux du rat et de la souris. Leurs caractéristiques physiologiques et comportementales sont donc les mieux documentées, en particulier dans la thématique de recherche sur le microbiote intestinal et l'axe intestin cerveau. La taille de la souris facilite la mise en place de l'expérimentation, étant donné le nombre d'animaux à prévoir pour ce type d'observations comportementales, c'est donc ce modèle qui a été choisi sachant que cette étude ne peut être faite *in vitro* ou modélisée *in silico* au vu de la multiplicité des paramètres susceptibles de déclencher la restriction alimentaire.

Le gavage sera réalisé par des personnes expérimentées. A part cet acte, notre protocole n'inclut aucun acte susceptible d'altérer le bien-être des animaux. Les souris, hébergées à 1 par cage (ce qui est nécessaire pour pouvoir étudier la prise alimentaire), seront surveillées quotidiennement. Les cages transparentes permettent de voir les congénères, et un enrichissement de milieu de vie sera procuré sous forme de bâtonnets à ronger ou papier à déchiqueter.

Chaque groupe expérimental (témoin, AM et MC) comprendra 12 souris, nombre classiquement utilisé pour des analyses comportementales car il permet d'enregistrer des différences significatives. Nous utiliserons des souris femelles adultes car les selles sont issues de patients/témoins de sexe féminin.

Un deuxième lot de souris mâles sera à prévoir qui sera utilisé en fonction des premiers résultats, pour permettre une comparaison plus facile avec nos données antérieures et celles déjà publiées dans la littérature (total n=96 souris).

Les résultats de cette recherche permettront d'avancer dans la compréhension des mécanismes déclencheurs de l'anorexie mentale.

La modulation du Microbiote Intestinal des malades par des probiotiques (micro organismes bénéfiques pour la santé de l'hôte), prébiotiques (molécules favorisant l'expansion des probiotiques), antibiotiques, ou par transplantation fécale constituera des perspectives thérapeutiques potentielles à envisager chez les patients atteints d'AM.

15980 La présence de cellules épithéliales mammaires dans le lait maternel a été mise en évidence depuis plusieurs décennies maintenant mais celle de cellules souches n'a été rapportée que depuis peu chez la femme, la souris, le caprin et le bovin. Le rôle de telles cellules dans le lait ou le colostrum n'est jusqu'ici pas clairement établi. Une des hypothèses avancées chez l'humain est que le transfert de ces cellules maternelles à la progéniture participerait au développement optimal de ses organes, au même titre que ses propres cellules souches, et stimulerait l'immunité du nouveau-né. De même, les cellules souches du lait pourraient participer à l'élaboration du phénotype des animaux de rente au cours de la phase précoce de leur développement, ainsi qu'à l'homéostasie, la réparation et / ou la régénération des tissus chez l'adulte. Si cela était avéré, le transfert de matériel maternel via le lait rendrait les phénotypes des animaux plus robustes (maturité des organes, amélioration de la santé post-natale, résistance aux mammites, etc...) pendant leurs phases de développement et leur vie adulte. A l'heure actuelle, peu de choses sont connues dans ce domaine et les seules études disponibles sur ce sujet concernent les espèces humaines et murines et non les espèces de rente. Cependant, comprendre les mécanismes de transfert de cellules de la mère à la progéniture via le colostrum et le lait représente un enjeu majeur pour la filière porcine, notamment dans un objectif de bien-être animal et d'amélioration de la survie et de la santé des porcelets en augmentant leur robustesse. Dans ce contexte et face au manque de connaissances dans ce domaine sur les espèces de rente telles que la truie, notre objectif est de déterminer et quantifier la présence de cellules souches dans le colostrum et le lait de truie puis d'étudier la dynamique de passage de ces cellules dans le lait au cours d'une lactation. Le projet sera mené dans le respect de la règle des 3R.

Son objectif étant d'établir la composition cellulaire des sécrétions lactées dans l'espèce porcine, les collectes de lait ne peuvent être réalisées que sur des animaux vivants (Remplacement), dans des conditions d'élevage contrôlées (Raffinement). Les prélèvements de colostrum et de lait seront réalisés au cours de la lactation. Le nombre de truies prélevées, à savoir 6, est réduit le plus possible (Réduction) mais sera suffisant pour un traitement statistique des résultats. Les truies seront conduites selon les normes en vigueur, avec un suivi continu de leur performance et de leur santé (Raffinement). L'ensemble des procédures et des observations seront effectuées par du personnel expérimenté (Raffinement).

15981 Chez tous les animaux, l'alimentation permet d'assurer l'équilibre physiologique tant en termes de développement que de santé. Les protéines des aliments apportent des acides aminés qui serviront à la synthèse des protéines de nature variée, de molécules à activités biologiques et à la fourniture d'énergie. Chez le porc élevé pour la viande, les acides aminés sont apportés majoritairement par les protéines végétales, la ration pouvant être équilibrée par l'apport d'acides aminés de synthèse. Ces derniers permettent de couvrir au mieux les besoins importants pour la croissance très rapide des porcs. Ils permettent en outre de limiter l'apport de protéines et in fine les rejets d'azote dans l'environnement. Les connaissances sur les acides aminés ont montré que ces nutriments avaient bien d'autres fonctions que celles de constituants des protéines musculaires et devaient être considérés également pour leurs rôles favorables au maintien de la santé. Ils sont alors des nutriments intéressants pouvant accompagner la démedicalisation en élevage. L'objectif de ce projet est de déterminer si l'apport d'un mélange d'acides aminés connus pour leurs effets bénéfiques sur des mécanismes de la construction et du maintien de la santé peut préparer les porcs à mieux s'adapter à un challenge inflammatoire appliqué ultérieurement. Plus spécifiquement, nous cherchons à montrer si l'apport de ces acides aminés permet de réduire les effets négatifs d'une réponse inflammatoire modérée induite par la dégradation des conditions d'hygiène du logement.

Le projet sera conduit sur 180 porcs de l'âge de 4 à 24 semaines, 4 semaines correspondant à l'âge de sevrage et 24 semaines à l'âge d'abattage des porcs charcutiers. De l'âge de 4 à 10 semaines, les porcs seront élevés en groupe et nourris avec un aliment couvrant leurs besoins nutritionnels supplémentés ou non avec un mélange d'acides aminés synthétiques choisis pour leurs rôles sur les mécanismes de la santé (développement du tube digestif, constituants de protéines immunitaires, antioxydants et anti inflammatoires). Ces acides aminés sont des additifs autorisés pour l'alimentation animale. De l'âge de 10 à 13 semaines, la moitié d'entre eux sera soumis à un challenge inflammatoire pendant 3 semaines. Le challenge consiste à élever les porcs dans des conditions d'hygiène dégradée, ce stress générant une réponse inflammatoire d'intensité modérée et induisant un ralentissement de la croissance. L'autre moitié sera élevée dans des bonnes conditions d'hygiène. Pendant ces 3 semaines, les porcs seront élevés en loge individuelle pour mesurer la consommation d'aliment et nourris avec un aliment conventionnel couvrant leurs besoins nutritionnels. A l'issue de ces 3 semaines, les porcs seront de nouveau élevés en groupe jusqu'à la fin de l'essai avant d'être abattus pour la consommation humaine.

La croissance (pesées régulières) et la santé des animaux seront enregistrées tout au long de l'essai. Des prélèvements de fèces seront effectués pour étudier l'effet des traitements alimentaires et des conditions d'élevage sur le microbiote fécal. Enfin, un nombre limité de prises de sang (4 au total) sera réalisé sur les porcs pour la mesure d'indicateurs du statut métabolique et d'immunité pendant la période de distribution des aliments expérimentaux et à la fin du challenge inflammatoire. La règle des 3 R sera respectée. Réduction le nombre de porcs est suffisant pour mettre en évidence un effet des traitements expérimentaux (alimentaire et conditions d'hygiène). Le nombre de prises de sang est limité et suffisant pour répondre aux questions scientifiques posées. Raffinement l'ensemble des procédures sera réalisé par du personnel expérimenté en respectant des points limites pour chaque procédure. Les animaux sont observés quotidiennement pour détecter et corriger, si cela n'interfère pas avec le protocole expérimental, les problèmes de santé par des mesures adéquates. Remplacement l'approche envisagée prévoit d'étudier le rôle d'ingrédients fonctionnels (acides aminés) sur la santé, la croissance et la physiologie des porcs, ne peut être réalisée que sur des animaux vivants dans des conditions expérimentales contrôlées.

15982 La cachexie cancéreuse est un syndrome multifactoriel auquel sont exposés la majorité des patients souffrant d'un cancer. Elle conduit à une perte massive de masse musculaire associée ou non à une perte de masse grasse. Cela affecte de façon importante la réponse aux traitements anti-cancer, la qualité de vie, l'autonomie et l'espérance de vie des patients. Il est donc indispensable d'identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans la cachexie cancéreuse pour élaborer des stratégies visant à améliorer le quotidien des malades et leur survie. Ainsi, notre premier objectif est d'identifier les mécanismes conduisant aux altérations musculaires dans un modèle murin de cancer du côlon. L'activité physique, connue pour améliorer les fonctions musculaires pourrait contrecarrer ces altérations. Ainsi, notre second objectif est d'évaluer l'impact de différents niveaux d'activité physique (AP) sur la cachexie cancéreuse. Pour se faire, 48 souris sont placées en cage individuelle agrémentée d'une roue d'activité, leur permettant de réaliser de l'AP volontaire, pendant 6 semaines. A la septième semaine, les animaux sont divisés en 2 groupes un groupe contrôle (n=24) et un groupe cancer (n=24). Seules les souris du groupe cancer sont soumises à une injection de cellules tumorales coliques. Directement après l'injection, l'ensemble des animaux sont répartis en 4 groupes 1 groupe contrôle inactif (n=12), 1 groupe contrôle actif (n=12), 1 groupe cancer inactif (n=12), 1 groupe cancer actif (n=12). Les animaux actifs, conservent l'accès à la roue d'activité jusqu'à la fin du protocole tandis que les animaux inactifs n'y ont plus accès jusqu'à la fin du protocole.

Ce projet de recherche a été pensé en respectant au mieux la règle des 3R. Remplacement : ce modèle expérimental *in vivo* ne peut pas être remplacé par un modèle *in vitro* car il résulte d'un dialogue entre la tumeur, le sang et le muscle. Réduction : Le nombre d'animaux a été déterminé afin d'obtenir des valeurs statistiquement significatives et scientifiquement irréprochables pour valider les données obtenues à la fin de la procédure. Dans notre étude, 48 souris mâles seront utilisées pour répondre à ces exigences statistiques. Raffinement : les animaux seront hébergés

dans une structure agréée qui tient compte de l'éthique animale. L'hébergement se fait dans des cages munies de jouets afin de minimiser le stress induit par l'hébergement. Le raffinement est complété par une surveillance journalière des animaux pour s'assurer que les conditions de bien-être sont respectées. En cas de souffrance constatée, toutes les mesures nécessaires pour réduire la souffrance seront mises en place (anesthésie, analgésie et/ou sortie du protocole).

15983 La néphronophtise est une maladie rénale héréditaire rare affectant l'enfant et l'adolescent. Cette affection est responsable de 10% des cas d'insuffisance rénale terminale chez l'enfant. Elle nécessite le recours à la dialyse ou à la transplantation rénale, deux procédures lourdes et coûteuses. La maladie se révèle par une augmentation du volume des urines et une soif excessive. En parallèle, le rein subit de nombreuses modifications qui aboutissent au développement de petits kystes, associés à une inflammation du rein aboutissant à sa transformation en un tissu fibreux non fonctionnel. Malgré les progrès considérables faits dans la compréhension de la génétique de la maladie (plus de 25 gènes ont été identifiés), les mécanismes moléculaires et cellulaires entraînant la destruction du rein sont encore mal compris. Actuellement, aucun traitement ne permet d'éviter aux patients d'évoluer vers l'insuffisance rénale terminale.

L'étude proposée ici a pour but de comprendre les mécanismes intimes à l'origine de la destruction du tissu rénal et de mettre au point de nouvelles stratégies thérapeutiques capables d'enrayer le développement de la maladie.

Les objectifs de ce travail sont de

1/ valider l'effet thérapeutique de molécules identifiées *in vitro*. Pour cela nous utiliserons une lignée de souris génétiquement modifiées qui récapitule les signes cliniques et histologiques de la pathologie humaine. Les molécules et leurs solvants seront administrés par voie intra-péritonéale avant le début de la maladie (1 mois de vie) et ce jusqu'au déclin de la fonction rénale normalement observé chez ces animaux (3 mois de vie).

2/ valider l'implication de nouveaux gènes dans la pathologie. Afin de tester l'interaction entre deux gènes, nous croiserons deux lignées de souris génétiquement modifiées l'une reproduisant la mutation la plus fréquente chez les enfants atteints de néphronophtise et l'autre reproduisant les signes cliniques et histologiques de la pathologie humaine.

3/ comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la détérioration du parenchyme rénal. Nous utiliserons une lignée de souris génétiquement modifiées reproduisant la mutation la plus fréquente chez les enfants atteints de néphronophtise. Nous appliquerons à ces animaux différents modèles déjà reconnus dans la littérature pour favoriser le développement des lésions rénales injection de cisplatine (administration par voie intra-péritonéale), injection de desmopressine (administration par implantation de pompes osmotiques) et administration de lithium (ingestion d'un régime alimentaire complétement en lithium).

Ces expériences utiliseront un maximum de 540 souris sur 5 ans. La fonction principale du rein étant la production d'urine, les urines de ces animaux seront récoltées. Les animaux seront sacrifiés à l'issue des protocoles et les organes seront prélevés en post mortem pour les analyses histologiques et moléculaires.

Les recherches préliminaires ayant permis l'identification des traitements et des gènes qui font l'objet de l'étude ont été menées sur des lignées de cellules afin de limiter le recours à l'expérimentation animale.

Cependant la néphronophtise est une néphropathie tubulo-interstitielle qui est caractérisée par un épaississement des membranes basales tubulaires, une fibrose interstitielle, un infiltrat inflammatoire et le développement de micro- kystes à la jonction cortico-médullaire. Le développement de cette maladie met en jeu des phénomènes complexes faisant intervenir différents types cellulaires ainsi que des modifications structurales du parenchyme rénal. A l'heure actuelle, il n'existe pas de modèle *in vitro* pertinent permettant de reproduire ces interactions cellulaires complexes à l'échelle de l'organisme entier. L'étude des mécanismes physiopathologiques impliqués dans le développement de la néphronophtise nécessite donc le recours à l'expérimentation animale

Toujours dans le respect de la règle des 3R

- Le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum permettant une analyse statistique efficace des résultats.

- Toutes les procédures douloureuses sont effectuées sous anesthésie générale associée à une analgésie pré- et post- opératoire. Des points limites ont par ailleurs été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire. Les souris seront hébergées en cage ventilée à 5 souris par cage et leur environnement sera enrichi par du coton, maisonnettes et tunnels ainsi que des bâtonnets de bois à ronger.

Pour conclure, les résultats obtenus devraient apporter une meilleure compréhension de la physiopathologie la néphronophthise et permettre le développement de médicaments capables de limiter sa progression.

15984 Les chevaux dysphagiques présentent généralement des phases de toux au moment des repas/ à l'effort et se caractérisent par un jetage alimentaire plus ou moins abondant. Chez des chevaux sains ou malades, le mouvement de déglutition lui-même n'est que peu ou mal observé lors des examens classiquement utilisés pour examiner le larynx/pharynx du cheval endoscopie trans-nasale au repos ou à l'exercice, échographie laryngée, radiographies avec liquide de contraste dégluti.

Le projet a pour objectif de documenter les mouvements du larynx lors de la déglutition par endoscopie trans-nasale et par abord trans-trachéal afin d'observer et d'associer la dynamique des parties crâniale et caudale du larynx. Ceci sera rendu possible par l'administration d'aliments aux chevaux, simultanément aux endoscopies.

L'endoscopie par voie trans-trachéale sera réalisée par la réalisation d'une trachéotomie et le passage d'un hémi-trachéotome métallique entre 2 anneaux trachéaux afin de pouvoir faire pénétrer l'endoscope de manière rétrograde dans la trachée.

L'éléments limitant de ces tests sera la tolérance à l'endoscope des chevaux pendant la prise alimentaire.

Les données observées pourront servir de base de comparaison et d'aide au traitement pour les chevaux dysphagiques.

L'étude sera réalisée dans un premier temps sur 4 chevaux désignés sains. Dans un second temps, en se référant aux premières données acquises, ce test sera réalisé chez des chevaux dysphagiques sur une période de 2 ans, tous les chevaux recrutés en clinique et présentés pour ce motif, apparu consécutivement à une intervention chirurgicale dite de laryngoplastie. Au total nous estimons que ce projet pourra être réalisé en recrutant un total de 8 chevaux dysphagiques soit 12 chevaux au total.

Les images enregistrées lors de ces examens seront analysées et les résultats traités de façon descriptive et /ou comparative.

Les animaux du groupe sain seront logés dans des box, soignés et sortis quotidiennement. Pour tous les chevaux, les examens seront réalisés dans un environnement calme, une légère trnaquilisation pourra être adiminstrée en fonction du stress du cheval, un anesthésique local sera instillé dans le nez pour rendre le passage de l'endoscope moins pénible une anesthésie locale sera réalisée pour permettre la mise en place du trachéotome. Les chevaux recevront un traitement analgésique et anti-inflammatoire pour pallier au désagrément de la trachéotomie réalisée pour la mise en place du trachéotome. Ils recevront tous des soins biquotidiens de la plaie afin que la cicatrisation se déroule bien.

Cette étude ne peut être réalisée que dans l'espèce cible de l'hémiplégie laryngée sujette à une opération de laryngoplastie. Les données déjà disponibles par les méthodes conventionnelles utilisées jusqu'ici (c'est à dire aspect sain d'un pharynx et d'un larynx à l'endoscopie par voie nasale) permettent de réduire à un effectif très faible le nombre d'animaux nécessaires pour la collecte des informations.

15985 Ce projet a pour ambition de développer des emballages actifs et intelligents répondant aux besoins des industries agro-alimentaires qui cherchent à développer une gamme biodégradable ou compostable et permettant une plus longue conservation des aliments frais et prétraités. Différents lipopeptides et peptides d'origine naturelle ont été identifiés comme possédant des effets antimicrobiens et antioxydants. Le but de cette étude est d'étudier la toxicité de ces molécules, seules ou en mélange, sur une période de 90 jours afin de justifier de leur absence de toxicité, mais également d'étudier leur impact sur la santé générale et le métabolisme des animaux. Dans ce projet le nombre d'animaux utilisé est de 130 souris sur 2 ans.

Les procédures expérimentales sont conçues pour respecter la règle des 3R et limiter le nombre d'animaux utilisés

- Principe de remplacement Il n'existe pas de méthodes alternatives ou de substitution nous permettant d'étudier la toxicité de molécules à des fins alimentaires. L'utilisation du rongeur (souris) nous permet de suivre le poids, la prise alimentaire et le comportement des animaux.

- Principe de réduction Le nombre d'échantillons testés ainsi que leurs concentrations est réduit grâce au test de criblage et de toxicité cellulaire réalisés *in vitro*.

- Principe de raffinement Les animaux sont surveillés tous les jours afin d'évaluer la présence de signes cliniques modérés de détresse au cours de leur hébergement. Les critères et signes qui permettent d'évaluer le niveau de douleur ou de stress ou la détresse des animaux ont été dégagés sur la base des critères établis par Morton et Griffiths (1985). Chaque procédure expérimentale sera réalisée par un personnel habilité. Lors des manipulations, les stratégies de raffinement des expériences (pièce calme, dispositions pour diminuer l'angoisse des animaux) seront réalisées par le personnel habilité. Lors des procédures expérimentales, les critères et signes permettant d'évaluer la vigilance des animaux et la présence de signes cliniques de détresse/douleur seront particulièrement étudiés. Si un animal présente des signes cliniques de détresse au cours d'une expérimentation, celui-ci sera rapidement euthanasié pour éviter toute souffrance.

15986 L'utilisation d'animaux à des fins scientifiques en France est réglementée par le décret 2013-118 et cinq arrêtés datés du 1er février 2013 et publiés le 7 février 2013, en application de la directive 2010/63/UE. Ainsi, des règles strictes, basées sur le principe des 3Rs, encadrent le fonctionnement de la recherche dans le domaine. De ce fait, les personnes utilisant des animaux se doivent d'être formées et qualifiées pour travailler dans ce domaine. Différents niveaux réglementaires permettent donc de définir les tâches que les personnels seront à même de réaliser ainsi que les niveaux de responsabilité par rapport à un projet donné.

De ce fait, afin d'assurer une formation complète à la direction d'études utilisant des animaux un nouveau diplôme de master a été mis en place à l'université dans lequel est inclus une formation spécifique en chirurgie expérimentale faisant l'objet d'une accréditation par le CNEA.

La formation est exclusivement réservée aux étudiants du Master 2 pour une capacité maximale de 15 personnes et se présente sous la forme d'une unité d'enseignement de 40 heures (10h de cours théoriques et 30 heures de TP). Elle a pour but de former les étudiants aux techniques de base de chirurgie chez les rongeurs et lagomorphes tout en respectant au mieux la règles des 3Rs. Ainsi, le maximum sera fait afin de réduire l'utilisation d'animaux grâce à des outils pédagogiques de substitution dès que cela est possible (exemple de mousses, substituts de peaux, vidéo etc...), ainsi il est prévu d'utiliser 32 souris Swiss, 32 rats wistar et 1 lapin néo-zélandais par session de formation soit un total de 275 animaux sur la durée de validité de la demande. L'enchaînement des enseignements a été réfléchi afin de pouvoir effectuer des procédures successives sur les mêmes animaux. De plus, il est prévu de reclasser une partie des animaux pour d'autres enseignements sur du comportement.

La formation pratique est indispensable à l'acquisition des méthodes et des gestes chirurgicaux, bien que le maximum de techniques seront réalisés sur des systèmes de substitutions, l'utilisation d'animaux paraît indispensable pour l'apprentissage de gestes chirurgicaux. De ce fait, toutes les procédures chirurgicales seront réalisées sous anesthésie générale associé à une analgésie sous la supervision d'enseignants experts dans les différents domaines abordés (neurochirurgie,

chirurgie cardiaque, chirurgie viscérale) pour un ratio de 4 étudiants par enseignant maximum. Une attention toute particulière sera apportée sur les notions stress et de bien-être animal. Les animaux seront hébergés dans des cages standards aux normes européennes. Les principes éthiques et les standards de raffinement seront utilisés jusqu'à la mise à mort de l'animal.

15987 La sérotonine (5-HT) est un neurotransmetteur impliqué dans de nombreuses fonctions physiologiques comme la thermorégulation, le cycle veille-sommeil ou la douleur. Ses altérations sont évoquées dans de nombreuses pathologies telles que la dépression, l'anxiété ou la mort subite du nourrisson.

Les études sur les récepteurs de la 5-HT ont retrouvé 7 familles de récepteurs et de nombreux sous-types, dont le récepteur de sous type 6, récemment identifié. Les études récentes ont montré son implication dans de nombreux processus physiologiques et notamment la régulation de la prise alimentaire et du poids.

Médicalement parlant, l'obésité correspond à un excès de masse grasse et à une modification du tissu graisseux entraînant des inconvénients pour la santé et pouvant réduire l'espérance de vie. C'est pourquoi, le surpoids et l'obésité sont aujourd'hui considérés comme une maladie chronique. Plusieurs facteurs – comportementaux, génétiques et environnementaux – sont impliqués dans le développement et la progression de cette maladie chronique.

Au-delà des mesures hygiéno-diététiques prescrites par les médecins, le soutien par des traitements médicamenteux reste très limité du fait de l'absence de connaissances sur les mécanismes physiopathologiques.

Nous proposons donc d'explorer l'évolution de la densité de récepteurs à la sérotonine de sous-type 6 chez des rats dont l'obésité i) aura été induite par un régime alimentaire riche, ou ii) aura une origine génétique. A l'aide d'une technique d'imagerie nucléaire, la Tomographie par Emission de Positons (TEP), nous pouvons suivre au cours de la croissance pondérale du rat la densité de ce récepteur dans le cerveau via l'injection d'un radiotracer spécifique.

Pour cela, notre projet de recherche appliquée mené sur 24 mois comportera deux procédures de gravité légère réalisées sur 54 rats au maximum.

Le projet se déroulera en deux temps, avec dans un premier temps une procédure pilote permettant d'explorer la faisabilité du modèle, dans un second temps l'étude expérimentale à proprement dite incluant un groupe contrôle non obèse, un groupe avec obésité induite par un régime gras, et un groupe avec une susceptibilité génétique pour l'obésité.

Remplacement un modèle animal est nécessaire car nous souhaitons explorer l'évolution de certains récepteurs suite à l'apparition d'une maladie chronique. Une fois la preuve de concept obtenue chez l'animal, ce projet d'imagerie sera rapidement transférable chez l'Homme en utilisant le même radiotracer.

Réduction le nombre d'animaux choisi correspond au minimum acceptable afin d'analyser les données de façon pertinente d'un point de vue statistique. Ce nombre est fonction du nombre d'exams techniquement réalisables par notre équipe. Le suivi longitudinal des rats en imagerie permet de diminuer le nombre utilisé. De plus une procédure préliminaire (procédure 1) est envisagée afin de s'assurer de la faisabilité du projet. En cas de résultats non satisfaisant après cette procédure, le projet pourra être arrêté.

Raffinement le choix de rats comme modèle repose sur le fait que pour la maladie étudiée (obésité) un modèle robuste et connu est développé. La prise de masse grasse sera contrôlée par imagerie et permettra d'inclure uniquement des animaux avec des caractéristiques d'obésité (moindre variabilité attendue). L'utilisation du tariquidar permet de réaliser ce type d'imagerie chez le rongeur plutôt que chez une autre espèce plus sensible (chat, singe). De plus, l'utilisation de tariquidar évite l'utilisation de ciclosporine, une molécule ayant la même capacité que le tariquidar, mais ayant un effet immunosuppresseur et neurotoxique chez le rat.

Concernant les molécules injectées (radiotracer et tariquidar), nous n'attendons pas d'effets secondaires. Ces molécules ont déjà été administrées à plusieurs reprises chez le rat dans d'autres

études menées par notre équipe ou d'autres centres. Le régime hypercalorique peut avoir des effets secondaires (urines et selles abondantes et nauséabondes, modification du transit intestinal) chez le rat mais le suivi régulier et l'identification de points critiques permettra de stopper le protocole à tout moment en cas d'inconfort pour le rat.

Nous espérons apporter une preuve de concept concernant l'implication des récepteurs de sous-type 6 à la sérotonine dans l'obésité et sa possible translation chez l'Homme, ainsi que la capacité de notre centre à réaliser ce type d'étude longitudinale chez le rongeur à l'aide du tariquidar.

15988 Lors de la mise au point de nouveaux médicaments, la réalisation de tests de dépistage pour évaluer l'activité de ces médicaments est nécessaire de manière à connaître l'effet du produit sur un organisme vivant et sur la pathologie associée.

Les tests d'efficacité sont une étape obligatoire et imposé pour tous les candidats médicaments en particulier dans le domaine des infections bactériennes avec des bactéries qui présentent des résistances aux antibiotiques.

Dans le monde, une mortalité importante est rencontrée à l'heure actuel pour des agents pathogènes qui sont multirésistants aux approches thérapeutiques classiques et plus particulièrement ceux de la classe KAPE (acronyme pour K. Pneumoniae, A. Baumannii, P. Aeruginosa et E. Coli).

Cependant les outils d'évaluation actuels de nouveaux traitements ne permettent pas de réaliser avec une bonne prédictivité l'efficacité d'un traitement sur l'animal puis chez l'homme.

L'objectif de ce projet est de développer une plateforme de tests reposant sur l'utilisation de souches bactériennes obtenues directement auprès des hopitaux sur des prélèvements de patients et qui serviront de bases aux différentes évaluations. La plateforme sera ensuite composée de trois entités afin de réaliser un screening permettant de réduire le nombre d'animaux utilisés puis de raffiner nos méthodes.

En effet, dans un premier temps les molécules seront évaluées *in vitro* sur les souches bactériennes puis sur un modèle intermédiaire avec l'utilisation de larves qui permettent de réaliser un screening puis en dernier lieu *in vivo* sur un modèle murin.

Le modèle larve présente l'intérêt de réduire le nombre d'animaux, d'être prédictif et de pouvoir mimer les infections bactériennes en première approche. La phase finale sur le modèle murin reste nécessaire pour les aspects métaboliques avec le devenir des molécules.

En effet, il n'existe pas de méthode alternative de remplacement permettant de modéliser de manière fiable la réaction d'un organisme entier vivant suite à l'injection d'un nouveau composé et l'efficacité d'un nouveau traitement.

Les modèles développés dans ce projet seront des modèles d'infection pulmonaire, de septicémie et d'infection urinaire.

L'utilisation de souris avec des bactéries pertinentes présentant les résistances aux traitements actuels sera une amélioration certaine des modèles de référence pour l'évaluation de l'efficacité de traitements. Il s'agit d'un animal couramment employé en expérimentation animale, permettant ainsi d'une part de gérer plus facilement son bien-être au cours de l'étude et d'autre part de travailler sur des lots homogènes (âge et sexe fixés).

De plus, les bactéries seront modifiées pour être suivies par imagerie. Le recours à l'imagerie médicale (bioluminescence, fluorescence) dans ce projet permettra de suivre directement au cours du temps le développement de l'infection et de suivre l'évolution de produits dans l'organisme. Ces techniques présentent l'avantage d'être non invasives (requiert seulement une légère anesthésie gazeuse) et ne nécessitent pas de sacrifice d'animaux au cours de l'étude (suivi des mêmes animaux au cours du temps - diminution de l'impact de la variabilité individuelle). Elles permettent ainsi de réduire le nombre d'animaux nécessaire.

Le stress des animaux sera pris en charge en respectant une période d'acclimatation de 2 jours après réception en hébergeant les animaux en groupe et en conservant autant que possible les groupes formés afin de maintenir la hiérarchie établie et en leur fournissant un enrichissement

spécifique. Des critères d'interruption ou « points limites » seront définis tout au long de ces études. Des méthodes pour prévenir l'apparition de ces points limites et essayer -dans la mesure du possible- de les traiter seront mises en place.

Un suivi quotidien des animaux sera réalisé afin de détecter tout signe clinique anormal et ainsi prendre les mesures nécessaires (mise en place d'un traitement ou mise à mort de l'animal) le plus rapidement possible.

Toute anomalie clinique sera rapportée au vétérinaire sanitaire référent de l'établissement. Si possible, des mesures thérapeutiques seront prises pour traiter les animaux en fonction des signes cliniques observés (injection de fluides / analgésiques, isolement, réchauffement, désinfection des plaies, etc). Un nombre de 50 études seront réalisées au cours de ce projet. Le nombre d'animaux sera variable pour chaque étude (environ 40 par étude et 50 études prévues pour ce projet). Un maximum de 2000 animaux sur l'ensemble du projet pourra être utilisé.

Le but de ce projet est de développer une plateforme de tests puis d'évaluer de potentiels futurs médicaments contre les affections bactériennes résistantes aux antibiotiques.

15989 Les techniques d'imagerie dite non invasives (IRM, scanner...) offre la possibilité de suivre des phénomènes biologiques complexes comme le développement d'une pathologie chronique (cancer, infection, inflammation, ...), de suivre la distribution et l'efficacité d'un traitement par des mesures répétitives tout en évitant la mise à mort régulière de grands effectifs d'animaux.

L'objectif général de ce projet est de développer et valider des formulations originales utilisant des nanoparticules qui peuvent contenir des agents thérapeutiques ainsi que des molécules de ciblage afin de favoriser leur action au niveau d'organes d'intérêt. Aujourd'hui, une nouvelle formulation thérapeutique contre le SARS-CoV-2 a été développée. Pour s'assurer de la valeur ajoutée de ces formulations, l'étude du devenir des nanoparticules dans l'organisme, après leur administration, constitue un enjeu crucial et nécessite l'analyse dans un organisme entier.

Grâce à des tests *in vitro*, le nombre de formulations thérapeutiques à évaluer a été réduit et deux d'entre elles ont pu être sélectionnées. L'objectif de cette demande d'autorisation est de suivre la biodistribution de ces nanoparticules sélectionnées, selon différentes voies d'administration (pulmonaire et intraveineuse), par différentes techniques d'imagerie tomographie à fluorescence et tomographie à rayons X. Pour cela les nanoparticules thérapeutiques seront administrées aux souris, la biodistribution est suivie par tomographie (rayons X seuls ou couplés à de la fluorescence), et ce pendant 21 jours. Pour obtenir ces séquences d'images, les souris sont anesthésiées et placées dans l'appareil de façon ponctuelle et pendant quelques minutes. L'impact sur le profil de biodistribution de l'ajout d'un agent thérapeutique anti SARS-CoV-2 au sein des nanoparticules sera également évalué.

C'est pourquoi aucune méthode alternative ne peut se substituer à l'utilisation des animaux pour la réalisation de notre projet. De plus, nous souhaitons identifier et prélever les organes ciblés en fonction de la voie d'administration. C'est pourquoi le modèle murin, bien caractérisé et facilement manipulable, est nécessaire.

Le nombre de souris nécessaires à nos travaux a été réduit au minimum sans compromettre l'analyse statistique de nos résultats. Une définition précise des points limites et une surveillance adaptée des animaux par un personnel compétent permet de limiter au maximum toute souffrance animale. Nous prévoyons d'utiliser au maximum 756 souris sur une période de 5 ans.

15990 La voie buccale, et en particulier la voie sublinguale, est une voie intéressante pour l'administration vaccinale car elle permet l'induction d'une double immunité dans le sang et dans les muqueuses (respiratoire et uro-génitales). La réponse immunitaire adaptative, c'est-à-dire la réponse spécifique à l'antigène administré, se met en place dès la prise en charge de l'antigène par les cellules immunitaires de la muqueuse. Le développement d'un vaccin à administration sublinguale doit prendre en compte des aspects physiques de mucoadhésion (pour augmenter le temps de rétention de l'antigène à la muqueuse) mais aussi des aspects immunitaires de ciblage de cellules présentatrices d'antigènes d'intérêt. Ce projet a pour but de caractériser les mécanismes de

transport et prise en charge d'antigène (protéine du VIH et protéine du virus de la grippe) en fonction de sa formulation (protéine libre, nanoparticule, patch mucoadhésif) et de caractériser les acteurs immunitaires en fonction de l'âge. La comparaison des panoramas immunitaires chez des souris jeunes (7 semaines) et des souris âgées (> 16 mois) permettra l'évaluation de l'immunosénescence de la muqueuse sublinguale, essentielle au développement d'un vaccin sur des populations gériatriques, en particulier pour un vaccin anti-grippe.

Ce projet comporte 5 procédures qui évoluent de formulations liquides (procédures 1 à 4, immunologie fondamentale) en formulation par patch (procédure 5), qui est l'objectif à atteindre pour le développement de nouvelles stratégies vaccinales par voie muqueuse.

Le modèle murin, qui est un modèle bien caractérisé et facilement manipulable, est nécessaire pour cette étude qui évalue des réponses tissulaires et immunitaires systémiques dont il n'existe pas d'alternative *in vitro* ou *ex vivo*. Toutefois, il est à noter que de nombreux tests préliminaires (cytotoxicité, internalisation d'antigènes par des cellules immunitaires...) ont été effectués sur différents modèles *in vitro* de culture cellulaire (Remplacement) dans le but de réduire le nombre d'animaux de l'étude.

Le nombre de souris nécessaire à nos travaux a donc été réduit au minimum (690 sur 5 ans) sans compromettre l'analyse statistique de nos résultats (Réduction). Ce projet comporte une définition précise des points limites et une surveillance adaptée des animaux par un personnel compétent ainsi que la mise en place de protocoles permettant de limiter la souffrance de l'animal au minimum (aucun acte de vaccination sans anesthésie gazeuse à l'isoflurane) (Raffinement).

15991 Les cancers du sein représentent un groupe hétérogène qui présente diverses altérations génétiques. Le récepteur aux oestrogènes (ERa) est à la fois un marqueur pronostic et prédictif de réponse à la thérapie endocrinienne. Cependant 40% des patientes traitées sont résistantes et rechutent. Récemment, une isoforme de ERa, ERa36 a été décrite comme étant exprimée à la membrane des cellules tumorales (40% des cas) et pourrait participer à la résistance aux traitements. Différentes études ont récemment montré que l'expression d'ERa36 est associée à une survie sans métastase réduite chez les patientes exprimant le récepteur à la progestérone (PR). ERa36 pourrait permettre de discriminer les patientes ER+, PR+, à priori de bon pronostic, mais qui cependant résistent au traitement et rechutent. Nous avons invalidé l'expression d'ERa36 dans la lignée T47D (PR+ et ERa36+) et nous avons montré que ERa36 perturbe la signalisation et les effets de la progestérone.

Notre projet a pour but de mettre en place des modèles précliniques en greffant la lignée T47D sauvage ou 2 clones invalidés pour ERa36 (KOERa36) à des souris afin d'étudier le rôle d'ERa36 dans la tumorigénèse mammaire et le développement de métastases.

Ce projet prévoit l'utilisation au maximum de 219 souris femelles qui vont permettre d'anticiper la réponse à l'hormonothérapie mais surtout de proposer un nouveau traitement en ciblant ERa36.

Les protocoles proposés répondent à la règle des 3R (Réduire, Raffiner, Remplacer). Ainsi, le nombre d'animaux nécessaires a été calculé de façon à apporter des réponses statistiquement fiables tout en évitant des mises à mort inutiles. Afin d'optimiser le nombre d'animaux utilisés, des techniques de pointe permettant la mesure précise de l'activation des voies de signalisation dans les cellules (cytométrie en flux, immunofluorescence sur coupes de tumeurs, imagerie du petit rongeur par analyse luminescence.) seront utilisés. Par ailleurs, la douleur et l'angoisse causées aux animaux seront évaluées et réduites à chaque fois que cela sera possible. Nous avons défini des points limite au-delà desquels les animaux seront mis à mort.

15992 La Polyarthrite Rhumatoïde (PR) est une maladie auto-immune invalidante qui survient dans environ 0,5 -1 % de la population. En l'absence de traitement, elle aboutit à une destruction articulaire avec un handicap fonctionnel. La PR étant encore mal comprise et les traitements devant être améliorés, les modèles d'arthrite de souris représentent des outils intéressants pour son étude. Les souris possèdent des articulations dont l'inflammation reproduit l'arthrite humaine.

La compréhension globale des maladies nécessite leur étude sur des organismes entiers. Nous avons à notre disposition des modèles de souris qui développent des pathologies proches de la PR humaine. Il existe un modèle d'arthrite qui permet, grâce au transfert de son sérum, d'induire une arthrite spontanément résolutive. Le transfert peut s'effectuer dans des souris génétiquement modifiées, ce qui permet d'étudier l'effet de gènes soit ajoutés, soit retirés du génome de la souris receveuse. Notre projet a pour but d'observer l'évolution de l'arthrite en fonction des gènes que nous avons modifiés.

Il permettra de définir quelles molécules peuvent être importantes dans l'évolution de la maladie et de comprendre quelles cibles peuvent être utilisées en thérapeutique humaine.

Afin d'être en conformité avec la règle des 3R, nous avons établi les principes suivants :

Remplacer la complexité de la maladie ne peut être étudiée qu'au niveau d'un organisme entier. Cependant, chaque fois que cela sera possible, les analyses seront effectuées sur des cellules en culture.

Réduire Le nombre de souris sera limité au strict nombre nécessaire pour une signification statistique des résultats.

Dans chaque groupe d'expérience, 6 à 8 souris seront utilisées.

Raffiner La douleur des animaux sera réduite au maximum par l'utilisation des anesthésiques et l'euthanasie si cela est nécessaire.

Points limites perte de poids supérieure à 20% (euthanasie), prostration, poil hérissé, absence de toilettage. Le score de l'arthrite (gonflement de l'articulation), s'il atteint le niveau maximum, sera pris en compte.

L'hébergement des souris sera le suivant 500 cm² / cage pour 2 à 5 animaux maximum. Un enrichissement de l'environnement sera effectué (coton, carton, "nid").

Une acclimatation d'une semaine des animaux sera assurée.

La température est maintenue à 20-22 °C.

Des cycles de 12h jour / 12h nuit sont maintenus.

Les zootechniciens sont présents tous les jours de la semaine.

Nourriture et eau seront procurés à volonté.

Le nombre d'animaux utilisé sur 5 ans sera de 1504.

15993 Le diabète est un problème de santé mondial touchant 415 millions de personnes dans le monde dont 90% sont atteints d'un diabète de type 2. Il est caractérisé par une hyperglycémie due à une résistance à l'insuline des organes cibles associée à une déficience de production de l'insuline par le pancréas. Il est clairement établi que le diabète est un facteur de risque majeur des maladies cardiovasculaires. En effet, il favorise notamment le développement de plaque de graisse dans les vaisseaux, qui a terme peut l'obstruer où dans les étapes ultimes se rompre et provoquer un infarctus, une ischémie ou un AVC en fonction du territoire concerné. Afin de limiter les effets délétères de cette plaque, un stent est alors implanté dans la région endommagée permettant de rétablir le diamètre du vaisseau, c'est la technique d'angioplastie. Malheureusement ce geste n'est pas sans conséquence et va provoquer le développement de complications artérielles qu'un épaissement de la paroi du vaisseau ou le développement d'une nouvelle plaque. Depuis 2002, ces stents libèrent des substances actives afin d'éviter ces complications, cependant, ces traitements se sont révélés peu efficaces chez les patients diabétiques car un risque accru de récurrence a été observé chez ces patients, qui pourrait être cause par l'hyperglycémie mal contrôlée et/ou à un état inflammatoire constant. Les substances libérées par les stents ont alors été constamment modifiées afin de diminuer ce risque sans résultats probants chez ces patients à haut risque cardiovasculaire. L'amélioration de ces molécules devient donc un besoin urgent afin de développer des thérapies post stent plus efficaces dans le cadre d'un diabète de type 2.

Ainsi, ce projet utilisera des souris génétiquement modifiées mise sous régime gras et comprendra des interventions chirurgicales afin de mimer chez l'animal la pose d'un stent dans l'artère

carotidienne d'un sujet diabétique. Une attention toute particulière au bien-être des animaux sera portée par l'application stricte de la règle des 3R dont les objectifs sont de réduire au maximum le nombre d'animaux, de raffiner en supprimant ou soulageant l'inconfort, la détresse et l'angoisse subis par les animaux et de remplacer l'utilisation des animaux en travaillant sur des cellules ou des tissus. Dans le cadre du raffinement, une procédure de prise en charge de la douleur (utilisation d'anesthésiant et d'antalgiques) sera mise en place avant, pendant et après les opérations chirurgicales afin de limiter la douleur et le stress et permettant une récupération optimale des animaux (utilisation de lampe et de table chauffantes, observation quotidienne des animaux, application d'un gel ophtalmique analgésique). Des points limites seront fixés et particulièrement observés au cours du projet permettant d'euthanasier les animaux dès leur apparition. Ces points limites se manifestent par des signes de douleur tels que la prostration, un rythme cardiaque irrégulier, un isolement vis-à-vis de congénères, une mauvaise alimentation au travers de la surveillance de la prise de boisson et de nourriture. Enfin, les conditions d'hébergement incluront les mesures de raffinement adéquates afin de limiter le stress des animaux (enrichissement du milieu de vie, respect de la sociologie et de leur vie en groupe, surveillance quotidienne).

Ce modèle d'étude animal ne peut par ailleurs pas être remplacé par un modèle *in vitro* car la validation finale de nouvelles molécules thérapeutiques nécessite d'utiliser un organisme dans son entier. En effet, l'approche sur cellules ne renseignerait pas sur l'ensemble des mécanismes impliqués. De plus les approches informatiques ne permettent pas à ce jour d'avoir accès à la fonction d'un organisme. L'ensemble des effets étudiés étant des effets physiologiques ou physiopathologiques, il n'y a pas d'autre alternative d'étude que l'utilisation de souris. Ce processus de formation de plaque d'athérome ne peut également pas être modélisé en boîte de pétri. Il n'y a donc pas d'alternative de remplacement.

Le nombre d'animaux a été réduit au maximum en respectant les contraintes de publication, sans compromettre les objectifs du projet et pour permettre de bonnes analyses statistiques (test Mann-Whitney, test non-paramétrique permettant de comparer deux échantillons indépendants de petite taille) et les expérimentations ont été optimisées pour être regroupées chez le même animal dès que possible. Les études statistiques antérieures ont montré que des groupes de 20 animaux sont en moyenne requis pour obtenir une distribution normale des mesures. Nous estimons utiliser au total 840 animaux traités ou non avec nos différentes molécules (42 groupes d'animaux comportant 20 animaux par groupes). Les groupes recevront des substances médicamenteuses différentes associées à leur contrôle.

En conclusion, ce projet permettra de proposer de nouvelles thérapies médicamenteuses afin de limiter voire d'éliminer les risques de rechutes chez les patients diabétiques après la pose d'un stents.

15994 Des diarrhées sont très souvent observées chez le jeune mammifère et en particulier chez les veaux l'élevage laitier, principalement de la naissance au sevrage. Elles représentent la seconde cause de mortalité des veaux, après la mortalité au vêlage. Ces diarrhées s'accompagnent souvent de retards de croissance qui peuvent être irréversibles, pénalisant ainsi le bon développement de l'animal et l'expression de son potentiel de production à l'âge adulte. Dans le contexte actuel de lutte contre l'antibiorésistance, des moyens de prévention permettant de diminuer le recours aux antibiotiques devraient émerger pour préserver la santé animale et humaine. A ce jour, la compréhension de la mise en place du microbiote digestif chez le jeune veau laitier et des facteurs pouvant la moduler constitue une voie d'identification de leviers pour prévenir l'apparition de ces diarrhées. Parmi les facteurs externes de modulation du microbiote digestif, on retrouve des facteurs alimentaires comme l'addition de levures vivantes (levure probiotique), de parois de levures. L'objectif de ce travail est d'étudier l'effet d'une supplémentation en parois de levure sur la mise en place du microbiote digestif et le statut immunitaire du veau laitier. Cette étude est réalisée dans une station expérimentale, où 20 veaux sont répartis en 2 lots un lot témoin (sans apport de parois de levure) et un lot traité (recevant des parois de levure). Les animaux sont élevés dans des conditions d'élevage conventionnel dans des cases individuelles jusqu'à l'âge de 9 semaines (en accord avec la directive européenne 2008/119/CE) puis ils seront en niche collective jusqu'à la fin

de l'essai (à 11 semaines). Les veaux sont suivis de la naissance au sevrage (9 semaines) et reçoivent une alimentation à base d'aliment d'allaitement, de foin et d'un aliment concentré riche en céréales et en protéagineux. De 9-11 semaines d'âge, ils recevront uniquement l'aliment concentré et du foin. Ils sont pesés une fois par semaine. Des prélèvements de contenu ruminal et de contenu fécal dédiés à l'analyse du microbiote digestif sont réalisés à 3, 35, 63 et 78 jours après la naissance. A ces mêmes dates, des analyses complémentaires sur les fèces sont réalisées afin d'estimer l'état des selles des veaux (mesure de la teneur en matière sèche) et d'identifier les pathogènes potentiellement présents (bactéries, virus et parasites). Des prises de sang sont réalisées à J35, J63 et J78 afin de suivre le statut immunitaire de chaque veau. L'étude du microbiote digestif devrait permettre de comprendre l'action des parois de levure sur la mise en place du microbiote digestif et de trouver, à terme, des solutions nutritionnelles destinées aux jeunes veaux pour favoriser la mise en place d'un microbiote digestif induisant une plus grande résistance du jeune aux diarrhées. L'étude de la réponse de l'hôte à un apport de parois de levure dans son alimentation implique l'utilisation d'animaux. Aucune mise à mort n'est prévue dans cet essai. A la fin de l'essai, les veaux intégreront directement un élevage. Aucune souffrance n'est infligée aux veaux. Ils sont élevés dans des conditions d'élevage conventionnelles. Le nombre d'animaux prélevés est limité à 10 veaux par lot, permettant de mettre en évidence l'existence ou non d'une modulation du microbiote digestif par l'ajout de parois de levure à l'alimentation du jeune. Une observation générale biquotidienne du comportement des veaux ainsi que de leur consommation d'eau et d'aliments permettra de s'assurer du bon déroulement du projet.

- 15995** Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) sont de manière prédominante d'origine ischémique. Plusieurs facteurs de risques favorisent le déclenchement de cette pathologie dont l'hypertension artérielle chronique (HTA) qui représente le facteur de risque le plus important. L'AVC représente la troisième cause de mortalité pour les hommes et la première pour les femmes. Cette maladie représente aussi la première cause d'handicap acquis chez l'adulte. Malgré les efforts et les progrès scientifiques réalisés ces dernières années dans la compréhension de la physiopathologie de l'ischémie cérébrale, l'efficacité des traitements disponibles chez l'Homme reste discutée. Il est ainsi très important de poursuivre des études précliniques visant à développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour les AVC. Chez le rongeur, la stimulation sensorielle (SS) dans la phase aigüe de l'AVC émerge actuellement comme une nouvelle approche potentielle simple et non pharmacologique pour réduire les dommages cérébraux. De même, plusieurs études montrent qu'une augmentation de l'apport en oxygène (oxygénothérapie) pourrait permettre de limiter l'hypoxie tissulaire associée à l'AVC et ainsi réduire le volume lésionnel cérébral. L'objectif de ce projet est d'évaluer l'effet de l'association d'une stimulation somatosensorielle à un traitement hyperoxique sur le volume de la lésion ischémique et la récupération fonctionnelle à la suite d'une ischémie chez la souris dans des conditions de normotension et d'hypertension artérielle chez la souris. Pour adresser cette question, le projet sera basé sur l'utilisation de l'IRM et de la microscopie biphotonique chez la souris après une ischémie cérébrale. La microscopie biphotonique représente une technique de choix et non invasive permettant de réaliser des images structurales et fonctionnelles *in vivo* à l'échelle cellulaire, avec une grande résolution spatiale et temporelle. Cette étude sera réalisée en suivant le principe des 3R (Raffiner, Réduire, Remplacer). Raffiner les animaux seront hébergés aux normes requises et le milieu sera enrichi. Une stratégie d'anesthésie et d'analgésie sera mise en place. Réduire les techniques de microscopie utilisée (microscopie biphotonique) et d'IRM permettent de réaliser plusieurs analyses sur le même animal et donc de réduire le nombre d'animaux utilisés. Remplacer la souris est utilisée comme modèle de choix dans la littérature pour étudier l'hypertension artérielle chronique et l'AVC qui ne peuvent pas être reproduits *in vitro*. le nombre de souris prévu pour cette étude est 120.
- 15996** Les cancers sont aujourd'hui la première cause de mortalité en France. Le fonctionnement de certains gènes, appelés suppresseurs de tumeur est de limiter l'apparition des cancers. La perte de fonction de ces gènes participe aux étapes précoces du développement tumoral. La souris peut être modifiée génétiquement de manière à perdre la fonction de ces gènes. Il s'agit à l'heure actuelle du meilleur moyen pour étudier les étapes précoces de la tumorigenèse. L'avantage de la souris est

aussi que certains modèles tumoraux peuvent être activés au niveau d'une seule génération et donc l'entretien des colonies se faire sans phénotype dommageable. De plus, l'étude des étapes précoces évite de générer la souffrance des animaux car elle s'intéresse aux événements ayant lieu avant l'apparition de la tumeur proprement dite. Dans ce projet, il ne s'agit que de la création de lignées murines obtenues en croisant des lignées de souris développant des tumeurs déjà bien caractérisées avec des souris ayant perdu un gène suppresseur de tumeur. Les souris qui ont une perte de fonction de ce gène ne présente pas de phénotype dommageable mais l'apparition de tumeur de la glande mammaire dans un contexte de pré-disposition est accélérée. L'impact de la perte de fonction de ce gène dans les étapes précoces de la tumorigenèse de la glande mammaire et du pancréas sera étudié. Dans le premier modèle, les souris développent des tumeurs de la glande mammaire. Le second, des tumeurs du pancréas. Dans les deux cas, seront prélevés les organes contenant les lésions pré-néoplasiques à deux temps précédants l'apparition des tumeurs. Les souris seront mises à mort au moment du prélèvement des lésions pré-néoplasiques et ne subiront aucun traitement ni prélèvement au cours de l'expérience.

Ces études permettront une meilleure connaissance des mécanismes impliqués dans l'initiation tumorale et pourront mener au développement de biomarqueurs et de méthodes de diagnostic précoce dans les cancers.

Afin de mener à bien ce projet, il sera mis en oeuvre en accord avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement. Une étude précédente a démontré l'implication du gène d'intérêt dans les étapes précoces de la tumorigenèse. Ces étapes dépendent particulièrement des interactions entre le tissu qui deviendra la tumeur et son environnement et la modélisation *in vitro* de ces mécanismes reste imprécise et sommaire. Afin de réduire au maximum le nombre d'animaux les croisements seront optimisés et les génotypages réalisés au plus vite de manière à ne générer que les individus nécessaires pour obtenir des données statistiquement interprétables. Les études seront raffinées en suivant un calendrier précis associé à une gestion des accouplements efficace qui permettra de limiter la génération d'animaux ayant un phénotype dommageable. Lors de ces études, les organes seront prélevés avant l'apparition des tumeurs pour étudier les lésions précoces. Le projet bénéficie de plus du fait que les modèles et les protocoles expérimentaux choisis sont utilisés en routine au laboratoire et bien référencés dans la littérature scientifique.

Au total, ce projet nécessitera l'utilisation au maximum de 370 souris.

15997 Le vieillissement de la population constitue un enjeu majeur en santé publique. En effet, entre 2015 et 2050, la proportion des 60 ans et plus dans la population mondiale va presque doubler, passant de 12% à 22%. Il est important que cet allongement de la durée de vie s'accompagne d'une amélioration de la qualité de vie. Dans ce contexte, le terme de « fragilité » a émergé ces dernières années pour désigner la diminution de la résistance des personnes âgées face à un stress, augmentant leur vulnérabilité et les exposant à un risque accru d'accidents et/ou de pathologies pouvant évoluer vers la dépendance. Au cours des dernières années, plusieurs études ont mis en évidence de nouveaux mécanismes responsables de l'apparition des pathologies chroniques liées à l'âge. Cela a conduit à l'émergence de thérapies visant à contrer ces mécanismes délétères. Le but général de ce projet est donc de tester de nouvelles cibles thérapeutiques afin de contrer les effets délétères du vieillissement. Nous utiliserons pour cela différentes conditions expérimentales qui miment le vieillissement physiologique et pathologique, ce dernier pouvant être accéléré chez l'animal par un régime riche en graisse. Ainsi, l'influence de l'obésité, facteur de risque majeur, sera également évaluée. Cette approche permettra ainsi la validation plus rapide des cibles identifiées. L'utilisation de ces modèles est nécessaire pour reproduire les différentes composantes de la pathologie humaine dans un système intégré, ce qui constitue un gage d'une meilleure transposition vers la clinique dont le besoin en nouveaux traitements est urgent. Les groupes expérimentaux seront au nombre de quatre dont 2 groupes en « régime normal » (analyses réalisées à 6, 12 et 18 mois) et 2 groupes en « régime riche en lipides » (analyses réalisées à 12 mois). Sur ce projet, un total de 200 souris non-consanguines seront utilisées

- Groupes « régime normal » avec ou sans traitement : 6 mois 20 mâles et 20 femelles - 12 mois 20 mâles et 20 femelles - 18 mois 30 mâles et 30 femelles

- Groupes « régime riche en lipides » avec ou sans traitement : 12 mois 30 mâles et 30 femelles

Lors de l'étude et dans un souci de réduction, chaque animal sera utilisé pour mesurer plusieurs caractéristiques (physiologiques, anatomiques, histologiques, biochimiques et moléculaires) du développement de la fragilité. Le nombre de souris mâles et femelles a été calculé selon la mortalité spontanée liée au vieillissement des animaux et induite par le régime riche en graisse. Il tient compte du nombre / type d'approches de phénotypage et de la variabilité statistique des données. Dans un souci de raffinement, nous allons veiller au bien-être des animaux qui seront élevés en milieu enrichi pour pouvoir composer une litière, avec libre accès à l'eau et à la nourriture. Les souris seront surveillées quotidiennement pour évaluer les signes de souffrance, détresse ou inconfort. Ce suivi comporte une évaluation de la perte de poids, de l'apparence physique et du comportement de l'animal. Un point limite (apathie, prostration, perte de poids supérieure à 20%, difficultés de déplacement) est clairement établi à partir d'un seuil observé qui déclenchera l'arrêt de l'expérience et la mise à mort des animaux.

15998 Le phénomène de fatigue est déjà décrit couramment dans des maladies chroniques inflammatoires comme les maladies auto-immunes, ou dans des pathologies non inflammatoires impliquant l'accident vasculaire cérébral ou le cancer. De plus, la fatigue constitue l'une des premières causes de plainte de la part des patients après chirurgie. La fatigue post-opératoire (FPO) est définie comme un « ensemble de symptômes physique et psychologique qui retardent le retour à une vie normale après la chirurgie » impliquant une mauvaise qualité du sommeil, des troubles de l'attention et/ou une somnolence diurne. Indépendamment du type de chirurgie, la FPO très souvent trouvée associée à la présence d'une fatigue pré-opératoire, qui peut être multifactorielle et intégrer des facteurs liés à l'indication chirurgicale mais aussi des facteurs psychologiques. Dans le cas du cancer, les traitements anti-tumoraux pourraient également participer à l'apparition de fatigue. La fatigue représente donc un réel enjeu de la prise en charge des patients. Les causes de la fatigue ne sont pas bien connues, mais il est probable que la fatigue regroupe des conditions complexes et multifactorielles, influencées par des facteurs émotionnels, cognitifs, inflammatoires et environnementaux. Parmi eux, l'agent anesthésique utilisé lors de la chirurgie pourrait participer directement à la FPO.

De fait, nous proposons d'évaluer, chez la souris, l'impact de 2 agents anesthésiants utilisés en pratique clinique courante (propofol ou sevoflurane) sur la réactivité émotionnelle et les fonctions cognitives (étude 1), sur le rythme veille/sommeil (étude 2) et la motivation (étude 3), chez des animaux élevés en condition normale ou soumis à un stress chronique modéré. Ce stress chronique vise à installer un état d'anxiété modéré qui pourrait mimer la « fatigue » susceptible de favoriser les effets des anesthésiques. De plus nous proposons d'évaluer l'impact d'une chimiothérapie suivant la période d'anesthésie générale sur les fonctions cognitives (étude 4) et l'anxiété, la dépression et la motivation (étude 5).

Dans le cas des animaux du groupe « stress » une procédure de stress chronique modéré classiquement utilisé sera mise en place pendant 4 semaines. Puis les agents anesthésiques seront administrés sur une durée de 4 heures. Les tests comportementaux débiteront après l'anesthésie et seront réalisés sur une durée de 4 jours suivant l'anesthésie (études 1-3). Pour les études 4 et 5, une chimiothérapie sera administrée sur une durée de 2 semaines après anesthésie et avant les tests comportementaux. Pour l'ensemble des 5 études, un total de 384 souris sera utilisé. Un test comportemental sera réalisé par jour et les animaux seront habitués à la pièce d'expérimentation 30 min avant le début du test.

L'ensemble du projet respecte la règle des 3R (remplacer, réduire, raffiner). L'animal est indispensable pour pouvoir évaluer les effets des anesthésiques en condition ou non de stress sur les fonctions cognitives et pour comprendre les mécanismes biologiques impliqués dans l'apparition éventuelle de troubles. Il n'est pas possible de s'affranchir de l'animal car des tests comportementaux sont nécessaires à ces évaluations. Afin de réduire le nombre total d'animaux, plusieurs procédures comportementales seront réalisées sur les mêmes animaux. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, des études permettant de mieux comprendre les mécanismes cérébraux impliqués dans la « fatigue », seront réalisées sur les animaux ayant été utilisés pour

réaliser les tests comportementaux. Dans chaque groupe d'étude et à la fin de chaque protocole, les cerveaux des souris seront prélevés et utilisés pour réaliser des études de biologie moléculaire et d'histologie. Les souris seront habituées aux conditions d'hébergement pendant les 2 semaines qui suivent leur livraison. Les conditions d'hébergement seront conformes aux normes réglementaires européennes. Les souris seront hébergées en groupe dans des cages de taille réglementaire, avec un enrichissement du milieu leur permettant de faire des nids. Au cours de cette période, les animaux seront progressivement familiarisés à la manipulation par l'expérimentateur. Durant toute l'expérimentation, un suivi quotidien des animaux sera réalisé par du personnel qualifié et expérimenté, notamment au moment des pesées, administrations des traitements et tests comportementaux, et permettra de détecter un éventuel signe de souffrance. En cas d'atteinte d'un point limite, une mise à mort anticipée sera réalisée après anesthésie et en accord avec le cadre réglementaire.

15999 Le pancréas est une glande située sous l'estomac, entourée par le duodénum. Elle a deux types de sécrétions, le premier type étant les enzymes pancréatiques qui se déversent dans l'intestin pour la digestion des aliments le deuxième type correspond à l'insuline et au glucagon qui régulent le taux de glycémie. L'insuffisance pancréatique s'observe dans les pancréatites chroniques, dont la première cause est l'intoxication alcoolique chronique. Elle s'exprime par une diminution des sécrétions pancréatiques, aussi bien exocrine qu'endocrine, et entraîne à terme une malabsorption des aliments (perte de poids) et la survenue progressive d'un diabète sucré. Son évolution se fait par poussées accompagnées de crises douloureuses digestives. Les complications d'une pancréatite chronique sont nombreuses (risque plus élevé de développer un cancer du pancréas, ascite, obstruction biliaire avec cirrhose hépatique secondaire). L'insuffisance pancréatique s'observe aussi chez les patients atteints de mucoviscidose, une maladie héréditaire qui est la plus fréquente des maladies génétiques de l'enfance. Elle est caractérisée par une anomalie de sécrétion des glandes. L'excès de ces sécrétions visqueuses touche différents organes, en particulier le pancréas, le foie, l'intestin et les poumons. Un seul médicament est disponible aujourd'hui pour le traitement de cette pathologie, la pancréatine (Creon®) disponible en différents dosages et formulations. Ce médicament montre des points faibles importants : il doit être administré en plusieurs prises quotidiennes au cours ou immédiatement après les repas. Les gélules doivent être avalées entières, sans être croquées, ni mâchées, avec suffisamment de liquide lors de chaque repas. Le but de notre projet est tout d'abord de mettre en place un modèle expérimental d'insuffisance pancréatique chez le rat adulte. Une fois le protocole expérimental mis au point, nous testerons 2 différentes formulations de pancréatine, c'est à dire le Creon® ainsi qu'une nouvelle formulation développée par une start-up française. Pour cela, il sera d'abord nécessaire d'induire la pathologie chez l'animal en réalisant une ligature partielle du canal pancréatique principal sous anesthésie générale. Ensuite, les animaux seront suivis pendant une semaine (prise de poids corporel et suivi de la glycémie) avant de commencer un traitement par voie orale avec les 2 médicaments à tester. Notre protocole expérimental respecte le principe des 3R (Réduction, Raffinement et Remplacement). Pour la Réduction du nombre d'animaux, le design de l'étude est un plan d'expérience contrôlé en mesures répétées, le nombre d'animaux est réduit à 12 animaux par groupe, et le nombre maximal de groupes pour chaque expérimentation sera de 6. Pour ce qui concerne le Raffinement, nous avons prévu de grouper les animaux 3 par cage, d'enrichir les cages d'hébergement par des tunnels en plastique rouge et par des barrettes de bois à ronger, afin de diminuer le stress des rats. De plus, tous les protocoles expérimentaux seront réalisés sous anesthésie générale (isoflurane) et chaque rat sera posé sur un tapis chauffant à 37°C afin d'assurer la température corporelle physiologique. Avant la chirurgie, un antalgique morphinique (Buprecare®) à la dose de 0.05 mg/kg s.c. sera administré et une crème à base de Lidocaïne (EMLA®) sera appliquée au niveau de la zone d'incision. Afin d'éviter l'assèchement de la cornée pendant l'anesthésie, les yeux seront traités avec un gel oculaire (Lubrithal®). Une injection post-opératoire de Méloxicam (Metacam®) à une dose de 1mg/kg sera réalisée après la chirurgie ainsi que les deux jours suivants. Le suivi quotidien des animaux permettra d'identifier tout signe de douleur ou de souffrance nécessitant une intervention la plus précoce possible. L'examen clinique des animaux permettra d'évaluer plusieurs paramètres de santé et bien-être. Nous allons

observer des signes comportementaux (perte d'appétit, perte de poids, diminution du comportement exploratoire, fuite ou défense à la manipulation, vocalises, automutilation dans les cas graves) ainsi que les apparences (hérissément du poil, pelage terne, expression faciale ou regard modifié, yeux mis clos, posture inhabituelle) et les signes cliniques (augmentation ou diminution de la fréquence de respiration, cyanose). Les points limites, conduisant à une euthanasie seront les suivants : perte de poids de plus de 20%, dos vouté, yeux fermés, poils hérissés, essoufflement, immobilité, état moribond. L'euthanasie sera réalisée par dislocation cervicale sous anesthésie à l'isoflurane. Pour ce qui concerne le Remplacement, malheureusement il n'y a pas en littérature de tests *in vitro* validés, donc l'utilisation d'animaux de laboratoire vivants est absolument indispensable pour étudier l'effet des médicaments à tester. Le nombre d'animaux sera de 288 par an, donc 1440 sur 5 ans.

16000 La stimulation de la prolifération des cellules souches hématopoïétiques (CSH) est un projet consistant à stimuler la prolifération naturelle de ces cellules grâce à l'utilisation de divers facteurs de croissance hématopoïétiques. Ces facteurs de croissance sont des molécules naturelles, dont la fonction physiologique consiste à stimuler la croissance, la prolifération et la différenciation des différentes lignées de cellules du sang. Chacun d'eux a ses cellules cibles spécifiques.

Synthétisés, certains facteurs de croissance peuvent être utilisés en thérapeutique comme médicaments, notamment en médecine humaine : anémies, après une greffe de moelle osseuse, ou encore en oncologie...

Ces études consistent à administrer à un animal le facteur de croissance nécessaire à la stimulation des cellules ciblées.

Les traitements sont réalisés conformément aux voies d'administrations, aux doses et aux schémas posologiques recommandés en fonction des informations disponibles sur la molécule et l'utilisation prévue. Des prélèvements sanguins ou de moelle osseuse peuvent également être réalisés dans le but de confirmer l'efficacité de la prolifération des cellules ciblées.

La stimulation de la prolifération des cellules souches hématopoïétiques nécessite l'utilisation d'animaux dès lors où aucune méthode substitutive n'existe. Le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum. En effet, de 2 à 6 animaux pourront être utilisés par étude selon les besoins. 3 études de ce type en moyenne pourront être réalisées par an. Ainsi, 90 animaux de chacune des espèces suivantes pourront donc être utilisés sur 5 ans lapins, équins, porcins, caprins, ovins, bovins, camélidés (lamas...) et volailles (poules, dindes, canards).

Afin de permettre aux animaux de s'adapter à leur environnement et de s'assurer de leur bon état de santé, une période d'acclimatation adaptée à l'espèce et au stade physiologique sera dispensée avant la 1ère administration et/ou prélèvement. Tout au long de leur hébergement, les animaux auront des conditions d'hébergement adaptées et optimales (logement, environnement, alimentation, apport en eau, soins). Les paramètres d'ambiance, l'aliment, l'abreuvement seront vérifiés quotidiennement. Par ailleurs, afin d'augmenter leur bien-être, les animaux seront hébergés collectivement dès que possible et disposeront d'un environnement enrichi. Si les animaux doivent être hébergés individuellement, ils auront un contact visuel et/ou olfactif avec leurs congénères.

Dans le but de repérer rapidement toute anomalie, les animaux seront suivis quotidiennement. Ainsi, si un animal montre des signes de pathologie, de souffrance ou de douleur, le vétérinaire (ou toute autre personne compétente) interviendra pour mettre en place un traitement thérapeutique et/ou des soins divers dans le but de le soigner ou de le soulager.

16001 L'IRM BOLD (Blood Oxygenation Level Dependent, ou Imagerie dépendante du niveau d'oxygène sanguin) est une technique d'imagerie fonctionnelle ayant fait ses preuves dans le domaine de l'imagerie cérébrale.

Très prometteuse pour l'étude des placentas dans le contexte des retards de croissance intra-utérins et plus récemment dans l'étude physiopathologique des organes fœtaux, elle fait l'objet de nombreuses recherches en imagerie fonctionnelle chez l'homme. Sa mise en œuvre nécessite une

hyperoxygénation du sujet à l'aide d'un masque facial, afin de réaliser des séquences en air ambiant puis sous oxygène, pour mettre en évidence un effet BOLD.

Cependant, la cinétique de la saturation de l'hémoglobine en O₂ en hyperoxie, et donc le temps optimal entre le début de l'oxygénation exogène et l'acquisition des images, ne sont pas encore bien définis car les données actuelles sont insuffisantes.

Chez l'homme, la seule évaluation possible est celle de la saturation trans-cutanée en oxygène qui est une mesure trop peu sensible et donc insuffisamment précise de la saturation de l'hémoglobine en oxygène.

Il nous est donc indispensable d'avoir ces mesures chez l'animal. Cette étude nous servira de modèle par la suite, afin de pouvoir exploiter ces données dans le protocole d'hyperoxygénation chez le rat pour l'IRM BOLD.

C'est pour cela que nous avons voulu étudier la cinétique d'évolution de la pression veineuse en O₂ après hyperoxie chez le rat afin de définir les modalités optimales d'hyperoxygénation pour l'acquisition des images BOLD, le but étant de limiter au maximum les manipulations excessives, tout en ayant une qualité d'image BOLD maximale.

La procédure consiste à réaliser des prélèvements sanguins veineux à intervalles réguliers sur une durée de 20 minutes grâce à un cathéter placé dans la veine cave inférieure sous-rénale par laparotomie, sous anesthésie générale.

L'ensemble de la procédure sera effectué sous anesthésie générale (Isoflurane 4 l/min à l'induction puis 2 l/min en entretien), administré à l'aide d'un masque facial, jusqu'à la mise à mort incluse.

L'analgésie per-protocole sera réalisée grâce à une injection sous-cutanée de 0.1 mg/Kg de Buprénorphine.

Si certains points limites sont atteints durant la procédure les animaux seront mis à mort de manière anticipée.

Tous les animaux seront mis à mort sous anesthésie générale, dès la fin de la procédure, à la suite des prélèvements.

Le nombre de rats est évalué à 20, qui seront divisés en 2 groupes de 10 un groupe sous 3 L/min, un groupe sous 6 L/min d'oxygène.

Les analyses statistiques ont été prévues pour diminuer au maximum l'effectif des groupes.

La cinétique de la pression veineuse en oxygènes chez le rat sous différents débits d'hyperoxygénation en fonction du temps nous permettra donc de paramétrer au mieux le timing des acquisitions de nos séquences IRM BOLD chez le rat, et par extrapolation chez l'homme.

16002 La maladie d'Alzheimer (MA) est caractérisée en particulier par l'accumulation excessive de peptide bêta-amyloïde (A-bêta) et une dégénérescence synaptique progressive menant à une atrophie cérébrale et à un déclin cognitif.

Chez les patients, l'accumulation excessive d'A-bêta semble résulter non seulement d'une surproduction mais également d'un défaut d'élimination de ce peptide. Plusieurs mécanismes contribuent à éliminer du cerveau le peptide A-bêta parmi lesquels son transport vers le sang à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE) et les plexus choroïdes. Diminuer la charge amyloïde cérébrale des patients en stimulant les mécanismes d'élimination du peptide A-bêta à travers la BHE pourrait être une stratégie thérapeutique efficace dans la prise en charge des patients atteints de la MA.

Le but de ce projet est d'étudier si le jeûne, une privation totale de nourriture pendant un temps court mais répétée périodiquement pendant plusieurs mois, est capable de stimuler les mécanismes d'élimination du peptide A-bêta du cerveau. Pour cela nous utiliserons les effets du jeûne sur des souris transgéniques surexprimant des gènes porteurs de mutations retrouvées dans les formes familiales de la MA, les souris 3xTg-AD. Nous utiliserons également des souris sauvages comme contrôle.

Le fonctionnement de la BHE et les adaptations (métaboliques, hormonales, comportementales, ...) qui découlent d'un changement de régime étant trop complexes pour être modélisées *in vitro*, ce projet nécessite l'utilisation d'animaux. Néanmoins nous satisferons aux exigences (1) de réduction, en limitant strictement le nombre d'animaux à celui nécessaire à la validité statistique des résultats obtenus et en utilisant, quand cela est possible, les mêmes animaux pour différentes analyses (tests comportementaux réalisés sur les mêmes animaux que ceux utilisés pour les analyses post-mortem) et (2) de raffinement, en limitant au maximum le stress et la douleur des animaux au cours des expériences (hébergement dans des cages avec litière et enrichissement, suivi régulier du bien-être des animaux, définition de points limites au-delà desquels les animaux doivent être euthanasiés). En revanche, le remplacement des rongeurs par des invertébrés, dont le système nerveux central et le métabolisme sont très éloignés de ceux de l'Homme, ou par des approches *in silico*, incapables de modéliser des processus aussi complexes que la régulation du métabolisme, ne permettrait pas de répondre aux questions posées et n'est donc pas envisageable pour ce projet. Notre projet est prévu pour durer 5 ans et nécessitera 4176 souris sur lesquelles nous étudierons l'effet du jeûne sur les mécanismes d'élimination du peptide A-béata du cerveau vers le sang à travers la BHE, sur la neuropathologie et sur le déclin cognitif.

Ce projet devrait permettre de savoir si le jeûne permet de stimuler les mécanismes d'élimination du peptide A-béata et/ou de modifier favorablement l'évolution des anomalies neuropathologiques et le déclin cognitif dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer.

16003 L'obésité est un problème majeur de santé publique car elle favorise le diabète ainsi que des maladies hépatiques telles que la stéatose (i.e. accumulation excessive de lipides dans le foie). Celle-ci peut évoluer vers des lésions hépatiques plus graves telles que la stéatohépatite et la cirrhose. L'aggravation de la stéatose peut être en partie liée à l'induction d'une enzyme spécifique, le cytochrome P450 2E1 (CYP2E1). L'activation de ce cytochrome a été rapportée au cours de diverses situations pathologiques (e.g. obésité, stéatose et diabète) et peut-être consécutive à l'action de certains acides gras (AGs). Grâce à des investigations *in vitro* réalisées sur une lignée cellulaire de foie humain, nous avons identifié l'acide linoléique (C18 2-LA) et l'acide linoléique (C18 3-ALA) comme AGs inducteur et inhibiteur respectifs du CYP2E1. Outre son rôle dans l'aggravation de la stéatose en stéatohépatite, le CYP2E1 peut également jouer un rôle important dans la toxicité hépatique de certains médicaments comme le paracétamol (PRC). En effet, l'activation du CYP2E1 favorise la transformation du PRC en un métabolite réactif toxique. Afin de déterminer si des doses thérapeutiques de PRC sont plus toxiques pour le foie dans un contexte de stéatose préexistante favorisant l'induction du CYP2E1, nous avons déjà réalisé une première étude sur des souris nourries pendant 2 mois par un régime standard (régime RS) ou un régime riche en lipides (régime hyperlipidique ou régime HPL) et traitées ou non par des doses thérapeutiques de PRC au cours du dernier mois. Dans cette étude, nous avons montré une légère induction du CYP2E1 et une toxicité hépatique du PRC modérée chez les souris nourries par le régime HPL et traitées par ce médicament (publication en cours). Chez ces animaux, nous avons aussi observé une stéatose hépatique moins sévère, une réduction du poids corporel et une diminution des taux circulants d'insuline. D'après nos données, le PRC pourrait avoir des effets sur le métabolisme énergétique global de la souris et la sécrétion d'insuline indépendamment de toute variation de la consommation de nourriture et de boisson. Pour mieux comprendre les effets métaboliques et la toxicité hépatique du PRC ainsi que l'implication du CYP2E1 dans l'aggravation à long terme de la stéatose, nous envisageons une seconde étude où des souris seront nourries par un régime HPL sur une période plus longue (i.e. 4 mois). Etant donné que l'induction du CYP2E1 joue un rôle important dans l'aggravation de la stéatose et dans la toxicité hépatique du PRC, le régime HPL sera enrichi ou pas en acide linoléique (régime HPL-LA) ou acide linoléique (régime HPL-ALA) afin de déterminer si l'induction ou l'inhibition respective du CYP2E1 pourrait moduler l'aggravation de la stéatose hépatique et/ou la sensibilité du foie à la toxicité du PRC. Comme dans la première étude, le PRC sera administré dans l'eau de boisson à l'équivalent de la dose thérapeutique maximale chez l'homme (i.e. 500 mg/kg/j). Ce projet nécessitera au total l'utilisation de 168 animaux. Ce projet de recherche a été pensé en respectant au mieux la règle des 3R.

Remplacement : ce modèle expérimental *in vivo* ne peut pas être remplacé par un modèle *in vitro* car il résulte d'un système physiologique complexe et total comprenant des interactions inter-organes et la sécrétion de nombreux facteurs métaboliques à différents niveaux de l'organisme. Réduction : le nombre d'animaux a été réduit au strict minimum nécessaire pour réaliser des analyses statistiques pertinentes et scientifiquement irréprochables pour valider les données obtenues à la fin de la procédure. Raffinement : les animaux seront hébergés dans une structure agréée qui tient compte de l'éthique animale. L'hébergement se fera en groupes sociaux et les animaux bénéficieront d'un enrichissement adapté dans chaque cage afin de minimiser le stress induit par l'hébergement. Le raffinement sera complété par une surveillance journalière des animaux pour s'assurer que les conditions de bien-être sont respectées. De plus, le suivi hebdomadaire du poids des souris et de leur comportement constitueront les principaux points limites.

16004 De nombreuses pathologies sont à l'origine de plaie cutanée aigue représentant un enjeu de santé publique. L'avenir de la chirurgie reconstructrice sera d'accélérer, voire de permettre une cicatrisation complète des plaies par des techniques utilisant les propres cellules du patient.

Les cellules souches issues de la graisse sont faciles à isoler contrairement aux cellules de la moelle osseuse. Elles pourraient devenir un outil thérapeutique pour accélérer la cicatrisation cutanée. Par ailleurs, le plasma riche en plaquettes (PRP) obtenu par une simple prise de sang représente une approche prometteuse. En effet, les plaquettes contiennent des facteurs de croissance impliqués dans la cicatrisation et des mitochondries nécessaires à leur métabolisme.

Lors d'une étude précédente, nous avons démontré que l'utilisation de cellules souches provenant de la graisse améliore de la cicatrisation cutanée suite à une perte de substance d'origine aigue et que leurs effets sur la réparation cutanée sont potentialisés par le PRP. Cette étude expérimentale a permis d'émettre l'hypothèse que le mécanisme d'activation des cellules souches passe par un transfert de mitochondries fonctionnelles. Afin de valider cette hypothèse, nous proposons dans la présente étude de reproduire notre modèle de lésion cutanée (modèle standardisé de plaie cutanée profonde sur souris) en ajoutant aux conditions déjà utilisées un traitement par des mitochondries exogènes et de la roténone (ROT), un inhibiteur de la fonction respiratoire des mitochondries ce qui les rend non fonctionnelles.

Par ailleurs, les effets positifs de la combinaison cellules souches issues de la graisse/PRP pourrait potentiellement améliorer la réparation tissulaire d'autres types de lésions et avoir des effets sur des lésions chroniques. Nous proposons de tester la combinaison cellules souches mesenchymateuses issues de la graisse +/- PRP ou avec des mitochondries exogènes pour traiter une lésion chronique dans le muscle strié squelettique. Pour ce faire, nous utiliserons un modèle de souris affecté d'une altération progressive de la fonction musculaire par l'absence de l'alpha-sarcoglycane (alpha-scga).

Pour diminuer le nombre d'animaux, chaque animal sera utilisé pour tester différentes conditions expérimentales de greffe (cellules souches +/- PRP +/- ROT ou cellules souches +/- mitochondries +/- ROT) avec les contrôles correspondants. Les animaux seront acclimatés une semaine à l'heure arrivée du fournisseur. Ils seront traités par antalgique en pré- et post-chirurgie/injections cellulaires. Les plaies cutanées et les injections cellulaires (sous-cutanées ou intra-musculaires) seront réalisées par une personne expérimentée en conditions d'aseptie sous anesthésie générale et sur un tapis chauffant. Après les traitements, les souris seront placées en cage de réveil avec lampe chauffante puis par 2 dans les cages d'élevage avec de la nourriture et du gel hydratant à disposition au fond de la cage.

Le recours à un modèle animal est nécessaire car les processus de cicatrisation cutanée et de régénération musculaire font appel à des interactions cellulaires complexes impossibles à recréer en dehors d'un organisme entier. Notre étude nécessitera 114 animaux (32 pour le modèle de plaie cutanée et 82 au total pour le modèle alpha-scga avec 32 animaux pour l'entretien de la lignée et 50 pour les expérimentations). Les animaux seront sacrifiés à 3 jours et 7 jours post-lésion et/ou greffes cellulaires pour analyses (histologie, biologie moléculaire et biochimie).

Ces expérimentations nous ont été demandées dans le cadre de la révision d'un article soumis pour publication.

16005 Le cancer est une maladie caractérisée par une prolifération incontrôlée des cellules de l'organisme. La réponse naturellement mise en place par le système immunitaire est inefficace pour limiter la croissance tumorale. Les vecteurs lentiviraux sont particulièrement intéressants pour une approche vaccinale thérapeutique dans le domaine de l'oncologie car ils permettent d'activer efficacement les globules blancs. Ces globules blancs activés peuvent alors jouer un rôle majeur dans l'élimination tumorale.

Les vecteurs lentiviraux sont encore très peu utilisés lors d'essais cliniques et nécessitent d'être étudiés plus en détails. Nous avons récemment montré que les vaccins lentiviraux que nous avons construits sont très efficaces pour l'élimination de tumeurs dans plusieurs modèles murins. L'existence de protéines spécifiques présentes uniquement dans les cellules tumorales permet de cibler les tumeurs. La vaccination avec des lentivirus permet ainsi d'induire des cellules spécifiques de ces protéines de tumeurs et capables de tuer les cellules tumorales avec une toxicité très faible pour le reste de l'organisme. Dans plusieurs modèles, nous avons ainsi montré que les tumeurs sont totalement éliminées en seulement 20 jours après vaccination.

L'objectif de ce projet est de comparer l'effet antitumoral d'une vaccination basée sur des vecteurs lentiviraux ou ADN nu. En effet, la vaccination ADN est une approche couramment utilisée et nous souhaitons déterminer si les vecteurs lentiviraux sont plus efficaces pour des approches de vaccination anti tumorale. Les mêmes antigènes vaccinaux seront utilisés avec les deux systèmes et l'activité anti tumorale sera comparée après vaccination.

Le bénéfice attendu de ce projet est le développement de vaccins thérapeutiques en oncologie humaine et plus particulièrement dans le cas de cancers induits par le papillomavirus, le cancer de la prostate, le cancer de la vessie et le cancer du côlon. Avant d'envisager leur utilisation chez l'homme, nous devons d'abord établir la faisabilité technique dans un organisme vivant en caractérisant les réponses immunitaires et anti tumorales induites par la vaccination. Ces réponses doivent être évaluées dans un organisme vivant du fait de la complexité des phénomènes impliqués. Les expériences de ce projet ont pour but de déterminer le meilleur système de vaccination thérapeutique antitumorale.

Après avoir précisé la dose et la voie d'injection du vaccin à utiliser dans une première procédure, l'efficacité anti tumorale sera analysée aussi bien dans la mise en place immédiate de la réponse immune que dans la mise en place d'une réponse à long terme. Les expériences d'efficacité anti tumorale de ce projet consistent à implanter une tumeur solide chez les souris, en injectant des cellules tumorales par voie sous cutanée qui en se multipliant vont former une tumeur solide en quelques jours. Une partie de ces souris sera alors vaccinée (avec VL ou vaccin ADN) alors qu'une partie sera traitée avec un vaccin contrôle (un vaccin sans les gènes tumoraux). La croissance tumorale est ensuite suivie par des mesures régulières de la taille de la tumeur.

Dans le respect de la règle des 3R, les conditions à tester lors des expériences seront déterminées par des expériences réalisées *in vitro* dès que cela sera possible (Remplacer), le nombre d'animaux utilisé sera réduit tout en conservant un minimum permettant d'obtenir des résultats significatif (Réduire). Le nombre d'animaux à utiliser a été déterminé avec l'aide d'un biostatisticien et des tests statistiques de type ANOVA seront réalisés pour déterminer la significativité de nos résultats. De plus, les animaux seront observés 2 fois par semaine au minimum afin de détecter d'éventuels signes de souffrance des animaux. La grille d'évaluation de la douleur nous permet d'établir des points limites qui entraineront la mise à mort de la souris dès leur apparition (Raffiner) (prostration, faiblesse pour se déplacer ou masse tumorale >1500mm³ par exemple).

Ce projet comporte 1 procédure légère (195 souris) et 2 procédures modérées (400 souris +200 souris) pour un total de maximum 795 souris.

16006 Les chiens d'assistance pour personnes déficientes (personnes mal ou non-voyantes, personnes atteintes d'un trouble du spectre autistique...) constituent aujourd'hui un enjeu d'utilité public, en

améliorant le quotidien des personnes bénéficiaires ainsi que la perception du handicap. La période d'élevage et de formation de ces chiens s'étale sur environ 2 ans. Jusqu'à leur 1 an, les chiens vivent exclusivement en famille d'accueil. Au cours de leur 2ème année, ils vont rentrer en formation dans leur école de chien guide la semaine, et revenir dans leur famille d'accueil chaque weekend.

Ce programme de formation montre cependant certaines limites, dans la mesure où en France 40% de ces animaux ne sont pas aptes à accompagner ces personnes, souvent pour des raisons comportementales. Les chiens non qualifiés sont pour la plupart détectés à la fin de leur formation, voir après la remise à la personne, engendrant des pertes importantes tant au niveau financier pour la structure (25 000 euros par chien) que psychologique pour le bénéficiaire.

Les raisons de ces échecs restent aujourd'hui encore méconnues. Cependant, il semble évident que le maintien du bien-être de ces chiens est un élément essentiel, favorisant de meilleures performances ainsi que la construction d'un lien fort et sécurisant avec les personnes qu'ils vont accompagner une bonne partie de leur vie.

Le projet suivant s'inscrit dans une démarche visant à estimer le bien-être des chiens d'assistance pour personnes déficientes, via l'évaluation de leur état émotionnel à travers l'exploration de biomarqueurs de cet état (i) marqueurs de stress chronique tel que ratio Neutrophiles Lymphocytes, niveau de cortisol dans la salive et les poils (ii) neuromodulateurs, telles que ocytocine, sérotonine, prolactine, en tant qu'indicateurs du niveau d'agressivité, d'anxiété, d'impulsivité, ou encore d'attachement et pouvant avoir une influence sur cet état émotionnel. Le recueil de ces paramètres dans différents contextes de la vie du chien (en famille d'accueil, en formation, et après la remise à un bénéficiaire), permettrait ici de faire un suivi de ces animaux, et de souligner un possible lien entre un état émotionnel favorable et leur réussite sur le long terme.

Pour répondre à cet objectif, il est évidemment nécessaire de recourir à ces animaux en particulier : les individus inclus dans cette étude sont des futurs chiens guides ou chiens d'assistance en cours de formation, quel que soit leur sexe. Il s'agit d'une étude longitudinale dans laquelle les chiens seront leur propre contrôle. En effet, ils seront suivis jusqu'à 2 ans après leur remise à un bénéficiaire, et auront donc entre 1 et 4 ans au cours de l'étude.

Les procédures potentiellement dommageables se limitent aux prises de sang pour l'évaluation de certains paramètres (ratio Neutrophiles Lymphocytes, ocytocine plasmatique, sérotonine et prolactine sériques). Elles seront raffinées (diminution du volume sanguin prélevé) par l'utilisation de méthodes alternatives non invasives en complément, telles que le prélèvement de salive et de poils pour notamment le dosage du cortisol, hormone indicatrice d'une activation du chien pouvant faire référence à un stress. De plus, elles seront raffinées car pratiquées par un vétérinaire expérimenté selon les bonnes pratiques cliniques. Ces prélèvements sanguins seront en outre aussi utilisés pour réaliser un bilan hématologique et biochimique afin de suivre l'état de santé des animaux tout au long de l'étude. Si l'état de santé des chiens et/ou leur comportement ne permet pas de réaliser ces prélèvements sanguins, il est prévu que la procédure soit arrêtée ou reportée.

La fondation avec laquelle nous collaborons peut former jusqu'à 12 chiens par an (équivalent à une classe de chien). L'intérêt est d'avoir un nombre d'individu suffisant pour que les résultats issus de cette étude soient interprétables au niveau de la population. Pour cela, cette procédure serait répétée sur plusieurs classes de chiens, afin de pouvoir inclure la population maximale disponible. Sur 5 ans, 60 chiens pourraient donc participer à l'étude (12 x 5). Il s'agit principalement de chiens de race St-Pierre, mais des Labernois, des Labrador ou encore des Labradoodle font également partie du programme. Les animaux utilisés sont des animaux préalablement socialisés et habitués à la présence de l'homme ainsi qu'à être manipulés.

Tout au long de l'étude, les chiens conserveront le mode vie nécessaire à leur formation (en centre de formation et familles d'accueil) et ils poursuivront leur formation aboutissant à un placement auprès d'une personne déficiente. L'étude et son issue ne remettent pas en cause ce devenir.

16007 Les altérations de l'homéostasie métabolique sont associées à des pathologies communes telles que l'obésité ou le diabète mais aussi à des maladies plus rares (chez l'enfant) comme l'atrésie des voies biliaires pour laquelle les mécanismes physiopathologiques (au niveau cellulaire) ne sont pas

encore bien caractérisés. Celle-ci n'ayant pas de traitement à l'heure actuelle il est important de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués afin de proposer de nouvelles stratégies de traitement aux patients, qui ont pour unique perspective la chirurgie et la transplantation hépatique.

L'objectif de ce projet de recherche est d'évaluer l'efficacité de différents traitements pharmacologiques aux fibrates qui sont des molécules médicamenteuses (déjà disponible sur le marché) utilisées pour réduire le cholestérol et les triglycérides. Notamment, nous tentons d'établir leur impact dans le foie de modèle murin qui ressemble fortement à l'atrésie des voies biliaires humaine afin de corriger les anomalies métaboliques et la fibrose hépatique. Dans le cadre de ce projet nous allons traiter les animaux avec différents types de fibrates à différentes doses et par différentes voies d'administration orales (nourriture ou gavage) puis récupérer leur foie et effectuer un panel d'analyses métaboliques, histologiques et moléculaires du tissu. Ce projet de 2 ans utilisera 457 souris.

Dans ce projet, le respect de la règle des 3R est assuré par les procédures mise en œuvre. Pour réduire le nombre d'animaux utilisés nous analyserons des paramètres multiples chez chaque animal, les animaux contrôles et mutants proviendront de mêmes croisements, nous générerons des cellules primaires pour des études *in vitro* et enfin nous utiliserons des tests statistiques adaptés. Pour le raffinement, les souris seront hébergées dans des cages enrichies en carrés de cotons et de nids afin d'assurer leur bien-être. Des points limites seront établis entraînant l'euthanasie de l'animal si nécessaire. Dans le cas d'une procédure entraînant une douleur nous utiliserons l'anesthésie générale afin de réduire la souffrance de l'animal. Enfin, nous ne pouvons pas remplacer le modèle animal car il est incontournable dans les essais précliniques de traitement pharmacologique.

En conclusion, ce projet permettra une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires et métaboliques impliqués dans l'atrésie des voies biliaires. De plus, dans une perspective d'essai clinique chez l'Homme, ce travail permettra de valider une cible thérapeutique et de commencer à évaluer une dose efficace de réponse au traitement.

16008 Parmi les outils à disposition de la communauté scientifique pour découvrir de nouveaux traitements possibles de pathologies humaines, nous retrouvons l'utilisation du modèle animal et la modélisation informatique *in silico*.

Ces deux approches présentées souvent en antagonisme, s'avèrent pourtant extrêmement complémentaires et doivent se nourrir l'une l'autre.

Dans un premier projet, nous avons utilisé le modèle animal Souris afin de générer des échantillons de tumeurs ayant pour source des mutations à caractère oncogène, c'est à dire susceptibles d'entraîner l'apparition de tumeurs.

Notre modèle d'étude était le cancer du sein, reproduit par des cancers de la mamelle chez la Souris.

Ces échantillons ont ensuite été analysés histologiquement, mais aussi au niveau des gènes et des protéines exprimés dans ces tissus.

L'ensemble des données générées ont été utilisées pour mettre en place une vaste modélisation *in silico* dont le but serait s'aider à la prédiction ou la validation de nouvelles cibles potentielles dans le traitement des tumeurs ayant notamment une origine génétique.

Par le biais de ce modèle *in silico*, plusieurs prédictions ont été émises sur les traitements les plus appropriés pour cibler les tumeurs apparaissant sur les différentes lignées de souris étudiées.

A partir des prédictions *in silico*, ce sont d'abord des études *in vitro* qui ont été réalisées sur des systèmes cellulaires ou organoïdes. Ce sont les hypothèses validées *in vitro* qui vont passer *in vivo* sur les modèles animaux pour être confirmées.

Afin de valider cette modélisation et ces prédictions, nous souhaitons donc dans ce nouveau projet réutiliser certaines lignées étudiées initialement et les traiter avec des composés spécifiquement choisis selon les prédictions.

Nous avons retenu 5 lignées pertinentes et souhaitons traiter celles-ci avec 4 molécules différentes, et ce à deux stades différents (précoce ou tardif) afin de mettre en évidence les modes d'action et la valeur prédictive de notre modèle.

REDUCTION les analyses effectuées dans le projet précédent nous ont permis de constater que dix animaux par groupe expérimental sont nécessaires pour obtenir des effectifs suffisants pour les analyses histologiques et protéiques prévues. Ce nombre constitue un compromis idéal entre la puissance statistiques nécessaire et les impératifs de réduction que nous endossons dans notre étude.

Au total, dans ce projet, nous prévoyons d'analyser 600 animaux (4 groupes traités comprenant chacun 10 animaux + 2 groupes contrôles comprenant chacun 10 animaux, à deux temps expérimentaux, pour 5 lignées différentes). De plus 192 animaux seront nécessaires pour générer les animaux expérimentaux. Soit un total de 792 animaux pour l'ensemble du projet.

RAFFINEMENT les cinq modèles de Souris porteurs de mutation génétiques entraînant l'apparition spontanées de tumeurs ont déjà été étudiés durant le projet précédent. Cette connaissance préalable nous permet de mettre en place les points limites nécessaires ainsi que les stades opportuns pour l'analyse des tumeurs selon chacune des lignées. Des points limites spécifiques sont donc liés à l'apparition et au volume des tumeurs, mais aussi à l'évolution du poids et de l'état général des animaux. De plus, étant donné que les traitements seront administrés par voie orale ou par injection de manière répétée, des points limites seront définis pour ces voies, en surveillant le site d'injection ou les minutes suivant les gavages. D'une manière générale, toutes les dispositions seront prises pour conserver les animaux dans les meilleures conditions possibles, avec un enrichissement, des conditions d'hébergement optimales, une surveillance quotidienne de leur état et des mesures précises des tumeurs deux fois par semaine.

REMPLACEMENT Ce projet vise à valider une étude réalisée sur un modèle informatique. Pour cela, nous n'avons pas d'autre option que d'utiliser le modèle animal qui apporte les réponses les plus proches de l'humain. Nous ne disposons actuellement pas d'autre option. Ce projet vise notamment, par cette validation, à fournir à la communauté scientifique un modèle informatique validé par des analyses *in vivo*.

16009 Le diabète de type 2 est une maladie surtout présente dans les pays développés, qui touche principalement les sujets adultes. Il s'agit de la forme de diabète la plus fréquente. Cette maladie est caractérisée par une résistance à l'insuline par les cellules de l'organisme. Ce qui entraîne dans un premier temps une augmentation de la production d'insuline, puis dans un second temps à un déficit en insuline suite à un épuisement du pancréas. Les traitements disponibles ne sont pas satisfaisants car le corps s'y habitue, il faut donc augmenter les doses et changer de classe thérapeutique. Par ailleurs, ils sont connus pour avoir de nombreux effets indésirables. C'est pourquoi, une équipe de recherche est en train de développer un nouveau traitement.

De nombreuses études *in vitro* sur des adipocytes primaires humains, disponibles commercialement, ont montré que ce traitement déclenchait une absorption rapide du glucose dans ces cellules humaines. Des études complémentaires *in vivo* ont ensuite démontré une amélioration dans l'utilisation du glucose au niveau systémique, en permettant notamment une diminution de la quantité de glucose circulant dans le sang sans provoquer d'hypoglycémie.

Jusqu'à présent, nous avons principalement testé notre approche thérapeutique sur des modèles de souris obèses en utilisant une alimentation riche en graisse et sucre. Ces modèles basés sur l'alimentation, bien qu'utiles, ne développent qu'un état d'intolérance au glucose et donc ne sont considérés que comme prédiabétiques. En effet comme démontré par la comparaison entre les différents modèles murins pour le diabète, les modèles murins pour le diabète basé sur l'alimentation ne développent pas les différentes phases du diabète comme observé chez l'homme, associé à une hyperinsulinémie, une polyurie/polydypsie provoquant les complications du diabète telles que la mort de cellules pancréatiques beta, néphropathie, etc.

Pour tester l'efficacité de notre traitement nous avons choisi un modèle de souris mutante qui développe une forme très agressive de diabète avec les différentes phases du diabète humain.

Le principal intérêt de cette série d'expérience est d'établir un effet dose dans un modèle reproduisant toutes les phases humaines du diabète de type 2 de notre produit en testant 2 concentrations différentes de peptides et d'en comparer l'efficacité avec un médicament anti-diabète déjà commercialisé.

Nous tendrons vers les objectifs préconisés de réduction du nombre d'animaux utilisés, de remplacement du modèle animal et du raffinement de la méthodologie utilisée de la manière suivante

(1) **REDUCTION** Le nombre d'animaux utilisé sera minimisé autant que possible grâce à l'étude de plusieurs paramètres chez le même animal. Ainsi 8 animaux par groupe seront utilisés. Un total de 32 souris sera utilisé pour ce projet.

(2) **RAFFINEMENT** Nous réduirons au maximum les techniques douloureuses ou stressantes. Les animaux seront hébergés dans les meilleures conditions possibles. Chaque animal sera suivi tout au long de l'expérience afin de détecter tout indicateur de souffrance et déterminer si besoin l'arrêt de l'expérimentation et son euthanasie.

(3) **REPLACEMENT** Des études préliminaires *in vitro* ont montré que ce traitement entraîne une absorption rapide du glucose dans des cellules humaines. L'approche animale se justifie par l'existence de modèles diabétiques permettant de valider les effets de la molécule thérapeutique dans un organisme entier, mais aussi d'étudier les effets secondaires, dont la néphropathie diabétique.

16010 Le déconditionnement musculaire, qui désigne une perte de masse et de force musculaire, peut être observé dans différentes situations physiologiques et surtout pathologiques (cancer, myopathie, insuffisances cardiaque, rénale ou respiratoire). Dans le cas du cancer, ce déconditionnement musculaire est extrêmement marqué (on parle de cachexie associée au cancer) et constitue un facteur péjoratif majeur contribuant à la réduction de l'état de santé et à la qualité de vie des patients.

La myostatine et l'activine A sont des facteurs circulants dont les propriétés cataboliques et anti-anaboliques ont bien été décrites dans la littérature. L'expression de la myostatine et de l'activine A est augmentée dans des modèles animaux de cancer.

Dans ce contexte, notre hypothèse générale est que l'inhibition conjointe de la myostatine et de l'activine A pourrait exercer un effet préventif sur la perte de masse musculaire induite par le cancer. Ces travaux de recherche seront effectués chez des souris mâles ApcMin/+, animal de référence pour ce genre d'approche et déjà largement utilisé au Laboratoire. Nos données antérieures nous ont permis de très bien caractériser l'évolution de la cachexie afin de mettre en place la surveillance de différents points limites pour le respect du bien-être animal.

L'inhibition de la myostatine et de l'activine A sera réalisée par l'injection intrapéritonéale d'une forme soluble du récepteur qui est commun à la myostatine et à l'activine A, le récepteur ActRIIB. Les injections (10 mg/kg) seront réalisées 2 fois par semaine pendant 10 semaines chez des souris ApcMin/+ âgées de 13 semaines. A cet âge, les souris commencent à développer une cachexie. Des souris ApcMin/+ et un groupe de souris de type sauvage recevront l'adjuvant (PBS). Toutes les 2 semaines un prélèvement sanguin sera réalisé afin de contrôler les concentrations circulantes en myostatine et activine A. A l'âge de 23 semaines, les souris subiront une anesthésie chimique sans réveil afin de réaliser une mesure de force au niveau du muscle tibial antérieur ainsi que pour prélever les muscles qui seront ensuite conditionnés et stockés pour des analyses histologiques et biochimiques ultérieures. Le foie des animaux sera également prélevé et conditionné pour des analyses biologiques ultérieures.

Compte tenu de la mortalité de souris ApcMin/+ (50% à 20 semaines) et malgré l'effet potentiellement positif du traitement sur la durée de vie des souris, 40 souris ApcMin/+ seront utilisées pour avoir au terme de l'expérimentation environ 10 souris par groupe. Le premier groupe de 20 souris recevra le traitement ActRIIB alors que le 2ème groupe recevra une injection équivalente en volume de l'adjuvant. Dix souris de type sauvage seront suivies en parallèle. Au total, nous prévoyons donc l'utilisation de 50 souris. Le déconditionnement musculaire associé au cancer met

en jeu un processus catabolique multifactoriel sollicitant de nombreux tissus (muscle, foie, tissu adipeux, tissus endocriniens, système immunitaire, système nerveux central). Un système expérimental *in vitro* ne permettrait pas de reproduire la complexité de ces régulations. Seul un modèle animal peut reproduire la complexité du phénomène. Pendant toute la durée du protocole, chaque animal bénéficiera d'une attention et de soins de qualité, par du personnel qualifié, pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. Par ailleurs, les animaux seront hébergés en groupes harmonieux (par 2) dans un environnement enrichi (copeaux, matériel de nidification, bâtonnets à ronger). Enfin, l'eau et la nourriture seront mises à disposition "ad libitum" et de la musique sera diffusée en salle d'hébergement pour diminuer le stress et atténuer les bruits environnementaux.

16011 Le traitement du cancer par immunothérapie est une avancée clinique majeure. L'immunothérapie consiste à faire combattre le cancer par le propre système de défense du patient, soit en stimulant son système immunitaire, soit en bloquant les mécanismes qui l'inhibent. Ces deux méthodes permettent de restaurer une réponse immunitaire efficace et robuste. La preuve de concept de cette nouvelle approche thérapeutique a été réalisée initialement pour les mélanomes cutanés, à l'aide d'anticorps qui sont désormais utilisés couramment en clinique. D'autres traitements du même type, ciblant d'autres cancers, sont maintenant également disponibles ou en cours de développement. Ce projet découle de résultats obtenus *in vitro* à l'aide notamment de lignées cellulaires en culture. Après des étapes *in vitro* pour caractériser les tumeurs et screener des molécules potentiellement thérapeutiques, et sachant que la tumeur interagit avec l'ensemble de son environnement *in situ* (vascularisation, stroma...) pour se développer, l'évaluation pré-clinique des traitements est nécessaire dans un système plus physiologique représentant un organisme vivant intégré tel que la souris.

Nous allons, dans un premier temps, développer et optimiser un modèle préclinique de souris humanisées, ce sont des souris immunodéficientes reconstituées avec des cellules du système immunitaire humain.

Dans un deuxième temps, ces souris seront injectées avec des cellules tumorales humaines ou greffées avec des fragments de tumeurs de patients pour différents types de cancer sélectionnés (entre autres mélanome cutané, mélanome de la choroïde, cancer du sein, du poumon et de l'ovaire). Enfin les thérapies seront administrées par gavage oral ou injection sous-cutanée, intrapéritonéale et intraveineuse. Les animaux seront particulièrement surveillés lors de ces procédures. Afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligée aux souris, les greffes de tumeurs se dérouleront sous anesthésie générale et des antalgiques sont prévus. Des points-limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire. Le nombre d'animaux est évalué à 9296 souris sur 5 ans.

Ce nombre a été réduit au minimum tout en assurant une puissance statistique significative des résultats obtenus.

Tous les patients ne répondent pas aux immunothérapies, ce projet devrait permettre de mieux comprendre les mécanismes de résistance au traitement et de choisir la ou les « molécules candidates » les plus prometteuses dans le traitement du cancer.

16012 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 7 jours) ou à long terme (jusqu'à 6 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 euthanasier 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.

Le nombre total d'animaux envisagé sur les 5 ans à venir est estimé au maximum à 1500 rats et 450 souris.

REDUCTION L'ensemble des procédures expérimentales nécessaires à l'accomplissement de ces études requiert un nombre total de 1950 animaux. Le nombre d'animaux a été défini pour obtenir des résultats satisfaisants (différences statistiquement observables entre les animaux traités et les animaux contrôles). Les études comportementales et la réponse aux traitements présentent une certaine hétérogénéité qui nécessite d'avoir un nombre d'animaux suffisant par lot ainsi que plusieurs lots pour valider les résultats.

RAFFINEMENT Dans tous les cas, l'ensemble des procédures expérimentales sera réalisé en limitant au maximum (durée et intensité) toute douleur et/ou stress pour les animaux, et en étant particulièrement vigilant sur les points limites afin de respecter au mieux le bien-être animal.

REMPLACEMENT Il s'agit d'un projet portant sur l'impact d'agents neuroprotecteurs avec des approches neuronales et vasculaires. Un tel projet de neurosciences intégratives ne peut être mené avec des méthodes alternatives *in vitro* et nécessite l'utilisation d'un modèle animal.

16013 Le péri-partum est une période où le fœtus est potentiellement soumis à des situations à risque pour son futur développement. L'infection intra-utérine et l'hypoxie (diminution de l'apport en oxygène du fœtus) peuvent être responsables d'une acidose sévère, qui elle-même peut être à l'origine de séquelles notamment cérébrales, ce d'autant si le fœtus est prématuré. L'objectif pendant le travail et l'accouchement est donc de repérer et de prévenir ces situations. Actuellement, la surveillance pendant la durée du travail est assurée par un enregistrement du rythme cardiaque fœtal (RCF). L'apparition d'anomalies du RCF (ARCF) peut être corrélée à une diminution de l'apport en oxygène au fœtus. Mais l'analyse de ces anomalies est subjective et difficile. Il est de plus constaté une grande variabilité entre les observateurs de l'analyse du RCF et la prise en compte du contexte est souvent insuffisante. En cas d'ARCF, des examens dits de seconde ligne sont possibles mais ont aussi leurs limites caractère invasif, intérêt contesté et subjectivité. La mise au point de nouveaux outils objectifs d'évaluation de l'hypoxie fœtale objectifs et par une méthode non invasive est donc essentielle. Le but de notre étude est de valider un nouveau modèle d'enregistrement de la variabilité du rythme cardiaque fœtal (par l'analyse des fonctionnements physiologiques qui régissent l'apparition d'une acidose), le fetal stress index (FSI), comme outil d'évaluation de l'hypoxie fœtale, sur un modèle animal ovin chroniquement instrumenté. La finalité de ces travaux serait l'application en pratique clinique comme élément de surveillance pendant le travail. Il n'existe pas, à notre connaissance, de méthodes de substitution à un modèle animal pour étudier la réponse due à un stress intra-utérin. Nous avons donc choisi comme modèle la brebis, espèce mammifère dont la physiologie au cours de la grossesse est proche de celle de l'espèce humaine. Le poids des fœtus agneaux est proche du poids d'un nouveau-né humain. De plus, contrairement aux truies, chien, souris et rat, les brebis ont des grossesses uniques ou gémellaires comme chez l'humain. Un nombre maximum de 120 brebis gestantes et 120 agneaux sera concerné sur une durée de 5 ans, soit 24 brebis et 24 agneaux par an. Après une semaine d'acclimatation aux locaux de l'animalerie, les brebis gestantes seront opérées sous anesthésie générale soit à 90-100 jours soit à 125 jours de gestation (terme 145 jours). Le fœtus sera abordé pour placer les cathéters artériels et veineux permettant les prélèvements sanguins, mais aussi un occluseur au niveau du cordon ombilical permettant la création du modèle d'hypoxie. Des électrodes thoraciques et cérébrales seront également placées pour recueillir le RCF et l'électro-encéphalogramme (EEG). Afin d'assurer un bon remplissage hémodynamique maternel avant l'induction de l'anesthésie générale et l'administration de produits anesthésiques, un cathéter central jugulaire sera posé au niveau du cou. Une période de 72 heures de récupération sera respectée avant toute expérimentation (délai nécessaire entre la chirurgie et la première expérimentation défini par notre expérience dans d'autres protocoles sur la brebis). Une infection intra-utérine puis une situation d'hypoxie fœtale seront alors induites et nous évaluerons l'évolution des paramètres

physiologiques, de la variabilité du RCF et de l'EEG en réponse, à la fois chez le fœtus à terme, mais aussi chez le fœtus prématuré. Ce travail expérimental est un des prérequis indispensables à une utilisation de notre outil d'évaluation de la variabilité du rythme cardiaque chez le fœtus humain. Afin de respecter la règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer), nous limiterons le nombre d'animaux en utilisant un même agneau comme son propre témoin. Le raffinement sera une préoccupation permanente aux différentes étapes du protocole expérimental (soins pré et post-opératoires, analgésie adaptée, points limites établis, procédure d'euthanasie établie). Après la manipulation, l'agneau pourra éventuellement être utilisé pour d'autre protocole si les paramètres hémodynamiques et gazométriques ont bien récupéré.